

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA



**DETERMINACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES Y
ESTUDIO MOLECULAR DE GANGLIO CENTINELA EN CARCINOMA
PRECOZ DE MAMA**

TESIS DOCTORAL DE:
ALMUDENA PÉREZ QUINTANILLA

BAJO LA DIRECCIÓN DE:
MARÍA ARÁNZAZU MORENO ELOLA-OLASO
MARÍA LUISA MAESTRO DE LAS CASAS
JOSÉ MARÍA ROMÁN SANTAMARÍA

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA



DETERMINACION DE CELULAS TUMORALES CIRCULANTES Y ESTUDIO MOLECULAR DE GANGLIO CENTINELA EN CARCINOMA PRECOZ DE MAMA

TESIS DOCTORAL

ALMUDENA PEREZ QUINTANILLA

Directores:

María Aranzazu Moreno Elola-Olaso

María Luisa Maestro de las Casas

Jose María Román Santamaría

Madrid 2013

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis ha sido larga y con diversos obstáculos, sobre todo por su carácter prospectivo, de recogida de muestras en momentos muy específicos y por la necesidad de financiación externa al hospital. Ha participado en ella de manera directa o indirecta una serie de personas a las que estaré eternamente agradecida ya que estoy convencida de que la elaboración de esta tesis me ha hecho aprender mucho como médico, como investigadora y como persona.

Para empezar me gustaría agradecer su colaboración a todas las enfermeras de las áreas prequirúrgicas y de recuperación postoperatoria que con paciencia me ayudaron a tomar las muestras de sangre, especialmente a Amparo, que me enseñó a ello. Y a las enfermeras de quirófano, siempre dispuestas a recoger las secciones del ganglio centinela para mi tesis.

También mis residentes pequeños me ayudaron mucho, sobre todo en el período en que yo ya no estaba en el Hospital Clínico pero seguía en la fase de recogida de muestras, en especial Yurena Díaz Bidart y Manuel Duárez, que me informaban de los días en que se iban a operar las pacientes incluidas en el estudio e incluso tomaron algunas muestras.

El equipo del departamento de Genómica del Hospital Clínico ha sido parte indispensable de todo el trabajo, ya que, aparte del gran trabajo de análisis, todas, técnicas y biólogas, Virginia, Sara, Beatriz, etc. estaban y están siempre ahí, dispuestas a darme información sobre una técnica, a sacar una foto del archivo, a recibir las muestras, a poner al día mi base de datos...En especial han sido de gran ayuda las recomendaciones sobre formato, tablas y contenido de la Dra. Marta Vidaurreta y sus ánimos cuando parecía que quedaba poco pero no se terminaba nunca.

La ayuda de Virginia Sebastian Ibáñez ha sido también imprescindible en todo el estudio estadístico, primero formando parte del equipo de soporte estadístico del Hospital Infanta Leonor y luego desde casa y “por amor a la ciencia”.

Mi más sincera gratitud a mis directores de tesis:

Al Dr. Román que me ha apoyado siempre y que, al formar este gran equipo de patología mamaria, me ha permitido aprender mucho sobre el cáncer de mama y me ha contagiado la pasión por esta especialidad tan bonita.

A la Dra. Moreno, que, siendo yo residente de segundo año, ante las miles de preguntas que le hacía sobre las pacientes operadas de cáncer de mama, me amenazó: “como sigas preguntando te voy a tener que buscar un tema de tesis” y que tuvo la brillante idea de estudiar las Células Tumorales Circulantes en cáncer precoz, en un momento en el que pocos habían oído hablar de ellas. Gracias a ella empezó todo y gracias a ella terminó, ya que sin su ayuda no se hubiera podido financiar la última parte del estudio.

A la Dra. Maestro, que me enseñó casi todo al principio, desde como realizar las extracciones correctamente o en qué consistía la técnica a cómo hacer un buen Power Point para el DEA; ha confiado siempre en mí y me ha animado constantemente, siempre disponible para las pequeñas dudas y para los grandes problemas, siempre exigente y

cercana. Ahora, en la última fase de la tesis, otra vez ha sido imprescindible su ayuda en las correcciones y recomendaciones.

Quiero agradecer a mis amigos su paciencia los días malos, todas las veces que me han tenido que oír el “en cuanto acabe la tesis...” y su apoyo constante, convencidos de mi capacidad de concluir este trabajo incluso cuando yo lo dudaba.

A Jörn por animarme a hacer la tesis “por si había que irse a Alemania” y por la ayuda con el inglés.

A mis compañeras de la Unidad de Mama del Hospital Infanta Leonor, las Dras Casariego, Martín, Gómez y Galán, y al resto de compañeros del Comité de Mama, en especial al Dr. Lara, la Dra. Lorente y la Dra. Rivera con los que aprendo diariamente la práctica clínica de la patología mamaria. También al Dr. Hernández-Aguado, mi actual Jefe de Servicio, por confiar en mí para formar parte de esta Unidad que tanto me gusta.

A mi abuela, mis tíos y mi hermano, por confiar siempre en mí.

A Dani, por su apoyo diario, constante, su paciencia infinita, por los días encerrado mientras yo escribía y por todo el “soporte técnico” con el Word, las tablas etc.

Especialmente quiero dar las gracias y dedicar esta tesis a mis padres, por enseñarme a querer saber siempre el porqué de las cosas, a aprender entendiendo, por desprender espíritu científico y humano, por exigirme y apoyarme en todo, por estar ahí siempre. También, más técnico, por las últimas correcciones finas del documento de la tesis. Ojala que, por medio de esta tesis y si el destino me lo permite, pueda llegar a ser tan buena profesora como ellos son.

Muchas gracias

INDICE

ÍNDICE.....	1
ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	13
SUMMARY (RESUMEN EN INGLÉS).....	26
INTRODUCCIÓN.....	37
I. EPIDEMIOLOGIA.....	37
II. ETIOPATOGENIA.....	40
II.A. FACTORES DE RIESGO DE CÁNCER DE MAMA.....	41
II.A.1 Edad y sexo.....	41
II.A.2 Factores reproductivos y hormonales.....	42
II.A.3 Antecedentes personales de enfermedad benigna de la mama.....	46
II.A.4 Antecedentes personales de cáncer de mama.....	46
II.A.5 Factores socioeconómicos y geográficos.....	46
II.A.6 Factores dietéticos.....	47
II.A.7 Factores familiares y genéticos.....	47
III. DIAGNOSTICO Y CLASIFICACION.....	49
IV. ANATOMÍA PATOLÓGICA.....	54
V. TRATAMIENTO.....	57
V.A. Tratamiento quirúrgico.....	58
V.A.1 Cirugía de la mama: mastectomía/ cirugía conservadora.....	59
V.A.2 Manejo de los ganglios axilares.....	61
V.A.3 Biopsia de ganglio centinela.....	62
V.B. Tratamiento Radioterápico.....	75
V.C. Tratamiento sistémico.....	76
V.C.1 Hormonoterapia.....	77
V.C.2 Quimioterapia.....	78
V.C.3 Terapia biológica.....	79
VI. FACTORES PRONÓSTICO.....	80
VI.A. Definiciones.....	80
VI.B. Factores Pronóstico Clásicos.....	82
VI.B.1 Estado de los ganglios axilares.....	82
VI.B.2 Tamaño tumoral.....	83
VI.B.3 Grado histológico.....	83
VI.B.4 Tipo histológico.....	83
VI.B.5 Edad.....	84
VI.C. Nuevos Factores Pronóstico.....	84
VI.C.1 Receptores hormonales.....	85
VI.C.2 Sobre-expresión del Oncogen HER2.....	86
VI.C.3 Marcadores de proliferación celular.....	87
VI.C.4 Gen P53.....	88
VI.C.5 Marcadores de angiogénesis.....	88
VI.C.6 Cathepsina D.....	89
VI.C.7 Activadores del sistema uroquinasa-plasminógeno.....	90

VI.C.8 Marcadores tumorales	90
VI.C.9 Perfiles multigénicos	91
VI.C.10 Células tumorales en médula ósea	92
VI.C.11 Células tumorales circulantes.....	93
VII. INFLUENCIA DE LA CIRUGÍA EN LA DISEMINACIÓN TUMORAL	96
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	99
PACIENTES Y MÉTODOS	101
I. PERIODO DE ESTUDIO	101
II. PACIENTES	102
II.A. Criterios de Inclusión.....	103
II.B. Criterios de exclusión	103
III. METODOLOGIA CLINICA	104
III.A. Procedimiento de recogida de muestras de sangre periférica	104
III.B. Localización de los ganglios centinela	105
III.C. Cirugía	108
III.D. Análisis intraoperatorio de los ganglios centinela	110
III.E. Recogida de datos	110
IV. METODOLOGIA ANALITICA	111
IV.A. Análisis de sangre periférica: Detección de CTC	111
IV.A.1 Principios del procedimiento	111
IV.A.2 Secuencia del procedimiento	113
IV.B. Análisis de ganglio centinela	114
IV.B.1 Estudio histológico.....	114
IV.B.2 Análisis Biomolecular del ganglio centinela.....	116
V. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA	123
V.A. Estudio descriptivo.....	123
V.B. Análisis de asociación entre variables.....	123
V.C. Detección de cambios en los niveles de CTC inducidos por la cirugía.....	124
V.D. Estudio de supervivencia global y libre de enfermedad	124
V.D.1 Definición de la supervivencia	124
V.D.2 Tablas de supervivencia acumulada y comparación de las curvas de supervivencia	125
V.D.3 Análisis univariable de la supervivencia mediante el modelo de riesgos proporcionales o regresión de Cox.....	126
V.D.4 Análisis multivariable de la supervivencia: Ecuación Final del Modelo de Regresión de Cox	126
V.E. Estudio de especificidad.....	127
V.F. Nivel de significación y programas estadísticos empleados.....	127
RESULTADOS	129
I. ESTUDIO DESCRIPTIVO.....	129
I.A. Estudio de la población.....	129
I.A.1 Tamaño muestral.....	129
I.A.2 Edad	129
I.A.3 Antecedentes familiares.....	130

I.A.4	Antecedentes personales.....	130
I.A.5	Características del tumor	131
I.A.6	Técnicas de imagen	133
I.A.7	Técnicas invasivas de diagnóstico cito-histológico.....	137
I.A.8	Tipo de cirugía.....	138
I.A.9	Número de cirugías.....	140
I.A.10	Ganglio centinela.....	141
I.A.11	Linfadenectomía	143
I.A.12	Anatomía patológica de la pieza quirúrgica	146
I.A.13	Receptores hormonales.....	148
I.A.14	HER2-Neu	149
I.A.15	Ki67	150
I.A.16	Tratamiento Adyuvante	152
I.B.	<i>Estudio descriptivo del análisis molecular del ganglio centinela:</i> <i>Mamoglobina y Citoqueratina 19.....</i>	<i>154</i>
I.C.	<i>Estudio descriptivo de la detección de células tumorales circulantes</i>	<i>156</i>
II.	ESTUDIO ANALÍTICO.....	160
II.A.	<i>Estudio de la Relación entre las variables clínicas de la población y la detección de CTC</i>	<i>160</i>
II.A.1	Edad.....	160
II.B.	<i>Estudio de la relación entre las características del tumor y la detección de CTC</i>	<i>161</i>
II.B.1	Multifocalidad	161
II.B.2	TNM	161
II.B.3	Estirpe tumoral	162
II.B.4	Grado y componente in situ.....	163
II.C.	<i>Estudio entre la actitud quirúrgica y la detección de Células tumorales circulantes.....</i>	<i>164</i>
II.C.1	Tipo de cirugía.....	164
II.C.2	Número de cirugías.....	164
II.D.	<i>Estudio de la relación entre la detección de CTC y la biopsia de ganglio centinela.....</i>	<i>165</i>
II.E.	<i>Relación entre la detección de CTC y los hallazgos inmunohistoquímicos ..</i>	<i>167</i>
II.F.	<i>Relación entre las variables clínicas de la muestra y los resultados de Citoqueratina 19 y mamoglobina en el ganglio centinela.....</i>	<i>173</i>
II.F.1	Tipo de cirugía	173
II.F.2	Tamaño tumoral	173
II.F.3	Estirpe tumoral.....	174
II.F.4	Componente in situ	175
II.G.	<i>Relación entre el resultado de la biopsia de ganglio centinela y LA detección DE Citoqueratina 19 y mamoglobina</i>	<i>175</i>
II.G.1	Estudio de Sensibilidad y Especificidad del estudio molecular (Citoqueratina 19 y Mamoglobina) respecto al estudio histológico del Ganglio Centinela	179
II.H.	<i>Estudio de la relación entre la detección de Citoqueratina19 y mamoglobina y la inmunohistoquímica del carcinoma de mama</i>	<i>183</i>
II.I.	<i>Estudio de la relación entre CTC1 y CTC2.....</i>	<i>192</i>
II.I.1	Influencia de la cirugía en la diseminación celular.....	194

II.J. Estudio de la relación entre la detección de Mamoglobina y Citoqueratina 19 en ganglio centinela Y de CTC	195
II.K. Estudio de la relación entre Mamoglobina y Citoqueratina 19	197
III. ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA.....	199
III.A. Tiempos de Supervivencia.....	199
III.B. Relación de la supervivencia global y libre De enfermedad con las variables estudiadas	200
III.B.1 Supervivencia Global	200
III.B.2 Supervivencia Libre de Enfermedad	211
III.C. Análisis de riesgos proporcionales para supervivencia global.....	223
III.D. Análisis de riesgos proporcionales para supervivencia libre de enfermedad	224
III.E. Ecuación del Modelo Final de Regresión de Cox para SG y SLE.....	225
DISCUSIÓN.....	229
I. ESTUDIO DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES	230
II. ESTUDIO MOLECULAR DEL GANGLIO CENTINELA	257
CONCLUSIONES	269
BIBLIOGRAFÍA	271

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Mortalidad proporcional por principales localizaciones. Hombres y mujeres. Comunidad de Madrid 2006.	38
Figura 2.	Tumor maligno de la mama en la mujer. Tasas de mortalidad estandarizadas por población europea, por 100mil. Comunidad de Madrid y España, 1975-2006.	39
Figura 3.	Tasas de incidencia, hospitalización y mortalidad por cáncer de mama según edad. Extremadura 2002-2004.	42
Figura 4.	Procedimiento de recogida de muestras de sangre periférica.	105
Figura 5.	SPECT-TAC en la localización de ganglio centinela.	108
Figura 6.	Metodología analítica. Extracción inmunomagnética y análisis citométrico.	113
Figura 7.	Primers empleados en la RT-PCR convencional de la citoqueratina 19.	118
Figura 8.	Primers empleados en la RT-PCR convencional de la mamoglobina.	118
Figura 9.	Electroforesis. Citoqueratina 19.	121
Figura 10.	Electroforesis. Mamoglobina.	121
Figura 11.	Localización de la lesión en la mama.	132
Figura 12.	Tipo de lesión en hallazgo mamográfico.	134
Figura 13.	Tipo de técnica de imagen realizada, porcentajes.	135
Figura 14.	Técnicas de diagnóstico cito-histológico realizadas y porcentaje de diagnóstico de malignidad con cada una de ellas.	137
Figura 15.	Tipo de cirugía indicado y relación con multicentricidad.	139
Figura 16.	Número de cirugías realizadas por paciente.	140
Figura 17.	Resultado histológico de biopsia de ganglio centinela.	141
Figura 18.	Número de ganglios centinela resecaados.	142
Figura 19.	Número de ganglios centinela positivos	143
Figura 20.	Número de Ganglios con metástasis (ganglios positivos en BGC+ ganglios positivos en estudio diferido de linfadenectomía)	144
Figura 21.	Tamaño tumoral, clasificación TNM.	146
Figura 22.	Tamaño tumoral, clasificación TNM. Subtipos.	147
Figura 23.	Estirpe tumoral por porcentajes	148
Figura 24.	Resultados del análisis de la inmunohistoquímica de los tumores en la muestra.	150
Figura 25.	Terapias Adyuvantes. Porcentaje pacientes tratadas con Quimioterapia, Radioterapia y Hormonoterapia.	153
Figura 26.	Análisis molecular de ganglio centinela, porcentaje de valores positivos de mamoglobina, citoqueratina 19 o ambas en ganglio centinela.	154
Figura 27.	Porcentaje de detección de Células tumorales Circulantes, valores absolutos e iguales o mayores a 2 células. CTC1: valores prequirúrgicos. CTC2: valores postquirúrgicos.	158
Figura 28.	Relación entre células tumorales circulantes en la detección postquirúrgica (CTC2) y el tipo tumoral. Relación estadísticamente significativa.	163
Figura 29.	Relación entre el resultado de ganglio centinela y la detección de CTC prequirúrgicas (CTC1).	166
Figura 30.	Relación entre CTC y hallazgos inmunohistoquímicos. Gráfico de medias y desviaciones estándar.	168
Figura 31.	Relación entre estudio molecular de ganglio centinela (mamoglobina y citoqueratina 19) y tamaño tumoral.	174
Figura 32.	Relación entre resultados de BC por técnica anatomopatológica y por PCR. Diferencias estadísticamente significativas por el estudio. Fisher's Exact Test $p=0,001$	176
Figura 33.	Relación entre resultados de biopsia de ganglio centinela y estudio molecular de mamoglobina y Citoqueratin19. Diferencias estadísticamente significativas por el estudio.	177
Figura 34.	Relación entre resultados de biopsia de ganglio centinela (mayor de 2mm) y estudio molecular de mamoglobina y Citoqueratin19. Diferencias estadísticamente significativas por el estudio.	178

Figura 35. Relación entre resultados de linfadenectomía y estudio molecular de mamoglobina y Citoqueratin19. Diferencias estadísticamente significativas por el estudio.	179
Figura 36. Curva COR para Mamoglobina y Citoqueratina respecto al estudio histológico de ganglio centinela.	181
Figura 37. Curva COR para Mamoglobina respecto al estudio histológico de ganglio centinela.	182
Figura 38. Curva COR para Citoqueratina respecto al estudio histológico de ganglio centinela.	182
Figura 39. Relación entre resultados del estudio molecular de mamoglobina y Citoqueratina19 con los hallazgos inmunohistoquímicos.	184
Figura 40. Relación entre resultados del estudio molecular de mamoglobina con los hallazgos inmunohistoquímicos.	185
Figura 41. Relación entre resultados del estudio molecular Citoqueratina19 con los hallazgos inmunohistoquímicos.	185
Figura 42. Relación entre Células Tumorales Circulantes prequirúrgicas (CTC1) y postquirúrgicas (CTC2)	193
Figura 43. Relación entre resultados de mamoglobina y Citoqueratin19. Diferencias estadísticamente significativas por el estudio.	197
Figura 44. Función de supervivencia: Relación entre supervivencia global y presencia de CTC prequirúrgicas.	203
Figura 45. Función de supervivencia: Relación entre supervivencia global y presencia de 2 o más CTC prequirúrgicas. Gv 2 o mas	204
Figura 46. Función de supervivencia: Relación entre supervivencia global y ausencia de receptores hormonales.	205
Figura 47. Función de supervivencia: Relación entre supervivencia global y fenotipo tumoral triple negativo.	206
Figura 48. Función de supervivencia: Relación entre supervivencia global y recidiva loco regional.	207
Figura 49. Función de supervivencia: Relación entre supervivencia global y metástasis a distancia	208
Figura 50. Función de supervivencia. Relación entre supervivencia libre de enfermedad y presencia de CTC prequirúrgicas.	214
Figura 51. Función de supervivencia. Relación entre supervivencia libre de enfermedad y presencia CTC prequirúrgicas mayor o igual a 2.	215
Figura 52. Función de supervivencia. Relación entre supervivencia libre de enfermedad y presencia CTC postquirúrgicas mayor o igual a 2.	216
Figura 53. Función de supervivencia. Relación entre supervivencia libre de enfermedad y ausencia de receptores estrogénicos.	217
Figura 54. Función de supervivencia. Relación entre supervivencia libre de enfermedad y fenotipo tumoral triple negativo.	218
Figura 55. Función de supervivencia. Relación entre supervivencia libre de enfermedad y recidiva loco-regional.	219
Figura 56. Función de supervivencia. Relación entre supervivencia libre de enfermedad y metástasis a distancia.	220

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	<i>Factores de Riesgo de cáncer de mama</i>	41
Tabla 2.	<i>Definiciones del TNM en el cáncer de mama</i>	52
Tabla 3.	<i>Agrupación por estadios</i>	53
Tabla 4.	<i>Subtipos histológicos de carcinomas mamarios y porcentajes</i>	55
Tabla 5.	<i>Contraindicaciones de cirugía conservadora</i>	60
Tabla 6.	<i>Recomendaciones de la Sociedad Española de Senología y Patología mamaria para la realización de Biopsia de Ganglio Centinela</i>	64
Tabla 7.	<i>Clasificación TNM. Hallazgos inmunohistoquímicos y moleculares en el análisis patológico del ganglio centinela</i>	74
Tabla 8.	<i>Categorías de Riesgo en pacientes operadas de cáncer de mama. Consenso de St. Gallen 2005</i>	77
Tabla 9.	<i>Factores Pronóstico clásicos</i>	82
Tabla 10.	<i>Linfogamagrafía. Utilidades</i>	107
Tabla 11.	<i>Mezcla de la reacción para el estudio de la citoqueratina 19 y mamoglobina, mediante el OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN)</i>	119
Tabla 12.	<i>Ciclos del programa del termociclador para la amplificación del RNA de la citoqueratina 19 y mamoglobina</i>	119
Tabla 13.	<i>Estudio Descriptivo. Características de la población</i>	131
Tabla 14.	<i>Estudio Descriptivo. Características del tumor y técnicas de imagen</i>	136
Tabla 15.	<i>Estudio Descriptivo. Técnicas invasivas de diagnóstico cito-histológico</i>	138
Tabla 16.	<i>Estudio Descriptivo. Datos quirúrgicos</i>	145
Tabla 17.	<i>Clasificación de expresión de Her 2 neu</i>	149
Tabla 18.	<i>Estudio descriptivo. Resultados de Anatomía Patológica</i>	151
Tabla 19.	<i>Estudio Descriptivo. Tratamiento Adyuvante</i>	153
Tabla 20.	<i>Estudio Descriptivo. Estudio molecular del Ganglio Centinela</i>	155
Tabla 21.	<i>Estudio Descriptivo. Detección de CTC</i>	159
Tabla 22.	<i>Detección de CTC prequirúrgicas (CTC1) en relación con las variables clínico-patológicas y factores pronósticos clásicos</i>	169
Tabla 23.	<i>Detección de CTC prequirúrgicas (CTC1) en relación con la técnica de ganglio centinela, linfadenectomía e inmunohistoquímica</i>	169
Tabla 24.	<i>Detección de CTC postquirúrgicas (CTC2) en relación con las variables clínico-patológicas y factores pronósticos clásicos</i>	171
Tabla 25.	<i>Detección de CTC postquirúrgicas (CTC2) en relación con la técnica de ganglio centinela, linfadenectomía, e inmunohistoquímica</i>	172
Tabla 26.	<i>Área bajo la curva ROC. Estudio molecular respecto al estudio histológico de ganglio centinela</i>	180
Tabla 27.	<i>Sensibilidad y especificidad del estudio molecular respecto al estudio histológico del ganglio centinela</i>	181
Tabla 28.	<i>Resultado de CK19 por PCR en ganglio centinela en relación con las variables clínico-patológicas y factores pronósticos clásicos</i>	186
Tabla 29.	<i>Resultado de CK19 por PCR en ganglio centinela en relación con la técnica de ganglio centinela, linfadenectomía, e inmunohistoquímica</i>	187
Tabla 30.	<i>Resultado de Mamoglobina por PCR en ganglio centinela en relación con las variables clínico-patológicas y factores pronósticos clásicos</i>	188
Tabla 31.	<i>Resultado de Mamoglobina por PCR en ganglio centinela en relación con la técnica de ganglio centinela, linfadenectomía, e inmunohistoquímica</i>	189
Tabla 32.	<i>Resultado de Mamoglobina y Citoqueratina 19 por PCR en ganglio centinela en relación con las variables clínico-patológicas y factores pronósticos clásicos</i>	190
Tabla 33.	<i>Resultado de Mamoglobina y Citoqueratina 19 por PCR en ganglio centinela en relación con la técnica de ganglio centinela, linfadenectomía e inmunohistoquímica</i>	191

Tabla 34.	Resultado de la relación entre CTC pre y postquirúrgicas	193
Tabla 35.	Resultado de la relación entre CTC y Mamoglobina	196
Tabla 36.	Resultado de la relación entre CTC y Citoqueratina 19	196
Tabla 37.	Resultado de la relación entre CTC y Mamoglobina y Citoqueratina 19	196
Tabla 38.	Resultado de la relación Mamoglobina y citoqueratina 19.....	198
Tabla 39.	Tiempos de seguimiento, supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad.	199
Tabla 40.	Comparación de las curvas de supervivencia para supervivencia global.....	201
Tabla 41.	Supervivencia Global. Análisis de la supervivencia en meses a los 6,12,36 y 48 meses.	209
Tabla 42.	Supervivencia Global. Análisis de la supervivencia en meses a los 6,12,36 y 48 meses(continuación).	210
Tabla 43.	Comparación de las curvas de supervivencia para supervivencia libre de enfermedad	211
Tabla 44.	Supervivencia Libre de Enfermedad: análisis de supervivencia en meses a los 6, 12, 36 y 48 meses.....	221
Tabla 45.	Supervivencia Libre de Enfermedad: análisis de supervivencia en meses a los 6, 12, 36 y 48 meses [continuación].....	222
Tabla 46.	Supervivencia Global. Análisis univariable mediante regresión de COX.....	224
Tabla 47.	Supervivencia Libre de Enfermedad. Análisis univariable mediante regresión de Cox.	225
Tabla 48.	Supervivencia Global. Modelo final para las pacientes de cáncer de mama ajustado por CTC.	227
Tabla 49.	Supervivencia libre de enfermedad. Modelo final para las pacientes de cáncer de mama.	227

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico
APC: Reactivo Fluorescente anti-CD45-Allophycocyanin
ARN: Ácido Ribonucleico
ASCO: American Society of Clinical Oncology
AUC: Área Bajo la Curva
BAG: Biopsia con Aguja Gruesa
BAV: Biopsia Asistida por Vacío
BGC: Biopsia del Ganglio Centinela
BHCG: Gonadotropina Coriónica Humana- Fracción Beta
BIRADS: Breast Imaging Report and Database System
BLN: Breast Lymph Node Assay
BRCA 1, BRCA2: gen Breast Cancer 1/ Breast Cancer 2
CA 15.3: Antígeno de cáncer 15-3
CEA: Antígeno Carcinoembrionario
CK18: Citoqueratina 18
CK19: Citoqueratina 19
CMF: Ciclofosfamida, Metotrexate, Fluorouracilo
CSE: Cuadrante Supero-Externo
CTC: Células Tumores Circulantes
DAPI: Reactivo Fluorescente para Ácidos Nucleicos
DE: Desviación Estándar
DF-3: Mucina Epitelial Polimórfica
dNTPs: Dinucleótidos Trifosfato
DTC: Células Tumores Diseminadas
EE: Error Estándar
EpCAM: Molécula de Adhesión de Célula Epitelial
FDA: Food and Drug Administration
FGF-2: Factor de Crecimiento Fibroblástico 2
FISH: Fluorescente In Situ Hybridation
GC: Ganglio Centinela

GnRH: Hormona Libradora de Gonadotrofina

HER2: Receptor 2 del Factor de Crecimiento Endodérmico

HR: Hazard Ratio

IC95%: Intervalo de Confianza 95%

IHC: Inmunohistoquímica

IMC: Índice de Masa Corporal

Ki67: Antígeno identificado con el anticuerpo monoclonal Ki67

MG: Mamoglobina

MGB1: Mamoglobina B1

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

MTS: Metástasis

MUC-1: Mucina Implicada en la Adhesión Celular

NCCN: National Comprehensive Cancer Network

NY-BR-1: Differentiation Antigen-Breast Cancer-1

OSNA: One-Step Nucleic Acid Amplification System

PAAF: Punción-Aspiración con Aguja Fina

PAI-1: Inhibidor 1 del Activador de Plasminógeno

PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PE: Reactivo Fluorescente anti-CK-Phycoerthin

RE: Receptores Estrogénicos

RIQ: Rango Intercuartílico

ROC/COR: Receiver Operating Characteristic o Característica Operativa del Receptor

RP: Receptores de Progesterona

RR: Riesgo Relativo

RT-LAMP: Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification

RT-PCR: Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa

SG: Supervivencia Global

SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad

SPECT-TAC: Tomografía Computerizada por Emisión de Fotones Simples Combinada con Tomografía Axial Computerizada

TDM1: Trastuzumab Emtansine (conjugado anticuerpo-medicamento)

TNEG: Triple Negativo

TNM: Tumor, Nodes, Metástasis

uPA: Uroquinasa Activadora de Plasminógeno

uPAR: Receptor del activador del sistema uroquinasa-plasminógeno

VEGF: Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular

WHI: Women's Health Initiative

RESUMEN

DETERMINACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES Y ESTUDIO MOLECULAR DE GANGLIO CENTINELA EN CARCINOMA PRECOZ DE MAMA

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es un problema sanitario y social de primera magnitud en todo el mundo, a pesar de los avances significativos en su diagnóstico y tratamiento. La principal causa de muerte relativa al cáncer de mama es la metástasis. Esta última es el resultado de diversos procesos al final de los cuales la célula tumoral es capaz de sobrevivir en órganos a distancia. En la actualidad un gran porcentaje de las neoplasias de mama se diagnostican en estadios operables y, de ellas, sólo el 24% de los casos presentan afectación axilar, principal factor pronóstico en estos estadios. Sin embargo, el 25% de pacientes con enfermedad localizada y ausencia de afectación axilar presentará recidiva sistémica a pesar de un aparente tratamiento primario exitoso, mientras el 30% de las pacientes con afectación axilar inicial no recidivan en los siguientes 5-10 años. Estos datos sugieren la existencia de factores que influyen en la dispersión hematógica del cáncer, diferentes al estadio ganglionar.

Desde el momento en el que el cáncer de mama se hace infiltrante, existe la posibilidad de diseminación celular al torrente circulatorio. La identificación de Células Tumorales Circulantes (CTC) tiene el potencial de convertirse en uno de los test

oncológicos más útiles al relacionarse con peor pronóstico debido a progresión de metástasis a distancia.

Los primeros y principales estudios sobre CTC se han centrado en cáncer metastático, demostrando ser un factor de predicción independiente de supervivencia total y libre de enfermedad. En 2004, Cristofanilli y colaboradores demostraron por primera vez, en cáncer de mama metastático, la asociación de CTC detectadas por el sistema CellSearch con peor pronóstico. Desde entonces se han realizado diversos estudios, tanto en relación a tratamiento quimioterápico o a seguimiento por técnicas de imagen en cáncer metastático como en relación a tratamientos neoadyuvantes en cáncer localmente avanzado, con resultados prometedores.

En la actualidad el peso de la evidencia apoya el papel de CTC como indicador pronóstico. Sin embargo, existen pocos estudios que relacionen CTC con cáncer de mama en estadios iniciales, necesarios para posibilitar su incorporación a la práctica clínica diaria.

OBJETIVOS

Se presenta un estudio de Cohorte prospectivo diseñado para investigar la presencia de CTC en sangre en pacientes diagnosticadas de carcinoma precoz de mama sin afectación ganglionar clínica o ecográfica a las cuales se les indica tratamiento quirúrgico primario y biopsia de ganglio centinela. Se evaluó la relación de la detección de CTC con el estado del ganglio centinela y con el resto de factores pronóstico. Se estudió la

influencia de la manipulación quirúrgica en la presencia o aumento de CTC en sangre. Por otro lado, se llevó a cabo un análisis molecular de los ganglios centinela mediante estudio por RT-PCR de Citoqueratina 19 y Mamoglobina. Seguidamente se realizó un estudio de supervivencia para evaluar el valor pronóstico de las CTC y del estudio molecular del ganglio centinela.

PACIENTES Y MÉTODOS

PACIENTES

Se seleccionaron pacientes con carcinoma de mama en estadios iniciales, T1-T2 en la clasificación TNM y sin afectación ganglionar inicial tras evaluación clínica y ecográfica, con indicación de cirugía primaria y biopsia de ganglio centinela. Se incluyeron en el estudio a 60 pacientes entre Agosto de 2007 y Marzo de 2010. Todas las pacientes fueron informadas y aceptaron formar parte del estudio.

METODOLOGÍA CLÍNICA

Se realizaron dos extracciones sanguíneas de 7,5ml a cada paciente, una previa a la cirugía el mismo día de ésta (extracción I, CTC1) y otra durante las primeras 12 horas posteriores a la cirugía (extracción II, CTC2).

Se completó el tratamiento quirúrgico adecuado, con cirugía primaria conservadora o radical según indicación y técnica del ganglio centinela. La detección ganglionar se

realizó en todos los casos mediante isótopo radiactivo Tecnecio 99 tras su inyección periareolar. Los ganglios centinela obtenidos se analizaron de manera intraoperatoria. En caso de detectar metástasis se realizó linfadenectomía axilar en la misma intervención. Por otro lado se realizó un estudio molecular de secciones del ganglio centinela mediante RT-PCR de Citoqueratina 19 y Mamoglobina y estudio histológico diferido del mismo.

DETECCIÓN DE CTC

Se realizó mediante la técnica estandarizada de CellSearch, basado en inmunocitoquímica. El CellSearch Kit contiene un reactivo de captura basado en un ferrofluido y reactivos inmunofluorescentes. El reactivo de ferrofluido consiste en nanopartículas con un núcleo magnético rodeado de una capa polimérica revestida con anticuerpos dirigidas al antígeno EpCAM (molécula de adhesión de célula epitelial) para la captura de las CTC. Tras la captura inmuno magnética y el enriquecimiento, se añaden reactivos fluorescentes para la identificación y enumeración de las CTC. Los reactivos fluorescentes incluyen: anti-CK-Phycoerthin (PE) específico para la proteína citoqueratina intracelular (característica de células epiteliales), DAPI (tinción para ácidos nucleicos) que tiñe el núcleo celular y anti-CD45-Allophycocyanin (APC) específico para leucocitos. Mediante un campo magnético se atrae a las células epiteliales marcadas con el ferrofluido. CellTracks Analyzer II obtiene automáticamente las imágenes y muestra cualquier evento donde CK-PE y DAPI aparecen en el mismo lugar. Las imágenes son presentadas en formato de galería para su clasificación final. Un evento es clasificado como célula tumoral cuando sus características morfológicas son coherentes con las de una célula tumoral y muestra el fenotipo EpCAM+, CK+, DAPI+ y CD45-. Las imágenes escaneadas por el

sistema se deben interpretar por dos investigadores expertos, formados específicamente en la identificación celular.

ANÁLISIS DEL TUMOR PRIMARIO Y DEL GANGLIO CENTINELA

El estudio histológico de los ganglios centinela se realiza por un patólogo experto, de manera intraoperatoria mediante impronta citológica y/o cortes congelados, y de manera diferida mediante tinción permanente con Hematoxilina-eosina. Se realizó linfadenectomía en todos los casos de ganglio centinela positivo o micrometástasis.

El análisis molecular del ganglio centinela se llevó a cabo por extracción y aislamiento de mRNA de Citoqueratina y Mamoglobina mediante reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa, seguido de medición de sus niveles mediante electroforesis en gel.

El tumor primario fue analizado histológicamente por método convencional y se realizaron detecciones por inmunotinción de receptores de estrógeno, progesterona, HER2 (Factor de Crecimiento Epidérmico) y Ki67.

METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

Se trata de un Estudio prospectivo de Cohortes de series de casos clínicos.

Se realizó un estudio descriptivo de las características de la población, del tratamiento y resultados obtenidos. Se realizó un análisis de asociación entre variables mediante la prueba exacta de Fisher, la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, la prueba de la mediana y el coeficiente de Spearman.

Para averiguar si la cirugía había modificado los niveles de CTC1 (pre-cirugía) y CTC2 (post-cirugía) se compararon mediante el test exacto bilateral de Wilcoxon y el test exacto bilateral de homogeneidad marginal.

Para estimar la probabilidad de supervivencia individual acumulada a lo largo del tiempo se empleó el método no paramétrico de Kaplan-Meier. La comparación de curvas de supervivencia se realizó mediante los test Log-Rank y Breslow.

El nivel de significación en la comparación se fijó en $\alpha=0,05$.

Se realizó un análisis univariable de la supervivencia mediante el modelo de riesgos proporcionales o regresión de Cox, con el fin de valorar el efecto de las variables independientes a estudio sobre la supervivencia (SG y SLE) y se definió una Ecuación Final del Modelo de Regresión de Cox.

RESULTADOS

La media de edad fue 58 años; el porcentaje de cirugía conservadora fue del 63%. En el 17% (n=10) de los casos, la biopsia de ganglio centinela resultó positiva para

malignidad, por lo que se realizó linfadenectomía en el mismo acto quirúrgico. Se encontró un solo falso negativo de ganglio centinela (0,2%) debido al hallazgo de un ganglio clínicamente sospechoso durante la cirugía a pesar de presentar ganglio centinela negativo.

El tamaño tumoral en el momento del diagnóstico fue de 17mm de media, dentro de T1-T2 en el 100% de los casos, con una distribución según la clasificación TNM en el que el 70% fue clasificado como T1 y el 30% como T2.

La detección de CTC prequirúrgica (CTC1) fue positiva en el 30,5% de los casos. En el análisis postquirúrgico de CTC (CTC2) se obtuvo igualmente un resultado de $CTC2 \geq 1$ del 30,5%, no diferenciándose de los hallazgos en la detección prequirúrgica.

Al cuantificar el número de CTC halladas, en la detección prequirúrgica se encontraron 5 casos (8,5%) de CTC igual o mayor a 2 y en ningún caso superó 5 CTC. En la detección postquirúrgica únicamente se objetivaron $CTC \geq 2$ en 2 pacientes (3,4%) y tampoco superaron en ningún caso la cifra de 5 CTC.

No se encontró relación estadísticamente significativa entre la presencia de CTC y las características clinicopatológicas ni inmunohistoquímicas del tumor. Sin embargo existe un aumento no significativo de detección de CTC1 (previo a cirugía) en las pacientes con multifocalidad, con tamaño tumoral mayor, con afectación ganglionar, con la positividad Her2 y la ausencia de receptores hormonales. Como excepción, se encontró una diferencia significativa entre los diferentes subtipos histológicos de carcinoma mamario y la detección postquirúrgica de CTC (CTC2), que fue positiva en el 37% de los casos de

carcinoma ductal, en el 33% de los casos de carcinoma lobulillar y en ningún caso en el resto de subtipos tumorales ($p=0,017$).

La tasa de detección de CTC pre y postoperatoria (CTC1 y CTC2) en nuestro estudio es concordante, del 30,5% en ambos casos, con una correlación del 73% en los valores negativos y de 39% en los valores positivos. Mediante la prueba exacta de Wilcoxon así como mediante la prueba exacta de homogeneidad marginal se comprueba que no se detectan diferencias estadísticamente significativas entre CTC1 y CTC2, por tanto, se puede concluir que no hay evidencia de que la cirugía modifique los niveles de CTC.

El estudio molecular de Citoqueratina19 y Mamoglobina mostró alta concordancia con el estudio histológico. La sensibilidad y especificidad del análisis de CK19 por RT-PCR fue de 40% y 98% respectivamente, con un área bajo la curva ROC de 0,69. La sensibilidad/ especificidad del análisis de MG fue de 50/98%, con un AUC de 0,74. El análisis conjunto de CK19 y MG mostró una sensibilidad/ especificidad de 50/96% respectivamente y la curva ROC reveló una AUC de 0,73.

ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA

Se ha realizado un seguimiento medio de 35 meses, durante los cuales han ocurrido 3 eventos, 1 recidiva locorregional y 2 pacientes con metástasis a distancia, las tres pacientes presentaron progresión de la enfermedad hasta muerte debido a cáncer.

Al realizar el estudio de supervivencia, se objetiva que la detección de CTC basales (CTC1), previas al tratamiento quirúrgico, es un factor independiente de mal pronóstico que se relaciona de manera estadísticamente significativa con mayor riesgo de supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad. ($p=0,033/p=0,033$)

La detección de CTC2 (postquirúrgicas) se relaciona con aumento de riesgo de supervivencia libre de enfermedad únicamente si es igual o mayor a 2 células, ($p=0,025$). Sin embargo no presenta relación significativa con aumento de supervivencia global.

Entre el resto de factores pronósticos de cáncer de mama, se objetiva un incremento de riesgo de recidiva y de disminución de la supervivencia estadísticamente significativa en los casos de receptores hormonales negativos y cáncer de mama subtipo triple negativo. No se encuentra relación estadísticamente significativa entre el riesgo de recidiva local, recidiva a distancia o supervivencia total con los factores pronóstico clásicos, como tamaño tumoral, grado histológico o estadio ganglionar.

En el análisis univariable mediante regresión de Cox, las variables significativas para supervivencia global y libre de enfermedad son la aparición de recidiva local o a distancia y la detección de CTC antes o después de la cirugía (CTC1+CTC2).

Finalmente, al realizar el análisis multivariante mediante el modelo de regresión de Cox, el HR global para SG y SLE fue significativo únicamente para la variable CTC. Concretamente, el HR global para SG fue de 4,71. Esto significa que globalmente la tasa de mortalidad fue de 4,71 veces superior cada vez que se aumentaba una unidad la variable

CTC. Lo mismo ocurre con HR para SLE de 5,05. La tasa de recidiva fue 5,05 veces superior cada vez que aumenta una unidad CTC.

CONCLUSIONES

- En nuestro estudio, la detección de Células Tumoraes Circulantes es un factor pronóstico independiente, en pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales, sin afectación ganglionar clínica prequirúrgica.
- No se encuentra correlación estadística de la determinación de CTC con el estado ganglionar definitivo, diagnosticado mediante biopsia selectiva de ganglio centinela, ni con ningún otro factor pronóstico estudiado.
- El estudio molecular del ganglio centinela mediante RT-PCR de Citoqueratina 19 y Mamoglobina presenta alta concordancia con el estudio histológico del mismo.
- Existe un incremento de riesgo de progresión de la enfermedad y de disminución de la supervivencia global significativa en los casos de receptores hormonales negativos y cáncer de mama subtipo triple negativo. No se objetiva relación de la supervivencia con el estado del ganglio centinela ni con otros factores pronóstico.
- No existe evidencia de que la cirugía aumente la diseminación de Células Tumoraes Circulantes.

- En cáncer de mama en estadio precoz, la detección de 1 CTC es válida como referencia en relación al pronóstico y no precisa un punto de corte mayor.
- Este estudio apoya la utilización de CTC en los algoritmos de cáncer no metastático ya que aporta información del posible proceso metastático y es un potente factor pronóstico. Es necesario realizar estudios más amplios para demostrar, de manera concluyente su utilidad en la clínica diaria.

SUMMARY

(RESUMEN EN INGLÉS)

DETECTION OF CIRCULATING TUMOR CELLS AND MOLECULAR ANALYSIS OF SENTINEL LYMPH-NODES IN EARLY BREAST CANCER

INTRODUCTION

Breast cancer is a major public health problem. The determinant factor of breast cancer related death is the appearance of metastasis as a result of several interacting processes which enable cancer cells to survive in distant organs. Nowadays most of the breast cancer diagnoses are made in operable stages, in which only 24% present affected axillary lymph-nodes, being the node status the strongest prognostic factor. However, about 25% of patients with early breast cancer without evidence of axillary lymph-node metastasis develop systemic relapse after apparently successful treatment, whereas almost 30% of the patients with axillary lymph-node metastasis will not relapse within 5-10 years after primary treatment. These data suggest the existence of different risk factors than the ganglionic stage which could be responsible for the haematogenous dispersion.

New prognostic factors as the immunohistochemical profile or the recent multigene expression tests have proved the usefulness of the knowledge about the biological and molecular mechanisms playing this way a pivotal role for the application of more specific and individualized treatment strategies.

The cells of breast cancer have the ability to disseminate in blood from the moment when it becomes invasive. The detection of Circulating Tumor Cells (CTC) could be a useful prognostic factor, due to its relation with the appearance of distant metastasis.

The first studies involving CTC have been carried out in metastatic cancer, proving to be an independent predictor of outcome. In 2004, Cristofanilli et al. demonstrated the association between detection of CTC by the CellSearch System and a worse prognosis in metastatic breast cancer. The CTC have also been studied along systemic therapy in metastatic cases and in non-metastatic cancer treated with neoadjuvant therapy. There is an increasing evidence that the presence of CTC is an independent predictor of progression-free survival and overall survival. However, there is few data concerning the prognostic importance of CTC in early breast cancer and an effort has to be done in order to introduce CTC into daily clinical practice.

OBJECTIVES

This is a prospective study designed to investigate the appearance of CTC in blood in early breast cancer patients (T1-T2) who present clinical negative lymph-nodes and indication of sentinel node biopsy. The CTC presence was correlated with the sentinel-node status and the standard prognostic markers. The influence of surgical manipulation in the increase of CTC in peripheral blood was also evaluated. Moreover lymph-node Citoqueratin19-Mammoglobin molecular analysis was carried out. Furthermore, survival analysis was performed to assess the prognostic value of CTC and of the sentinel node molecular studio.

PATIENTS AND METHODS

PATIENTS

Eligibility criteria were followed in order to select female patients with invasive early breast cancer with T1-T2 in TNM staging and no lymph-node metastasis detected by clinical and ultrasonographic evaluation, all of them prescribed to undergo primary tumor surgery and sentinel lymph-node biopsy (SLNB). 75 patients were enrolled between august 2007 and March 2010, 15 of them being invalidated during the processes. Informed Consent was required to be signed by all patients.

CLINICAL PROCEDURES

Pre-surgery and post-surgery blood samples were collected for CTC detection. 7,5ml of blood obtained before surgery (CTC1) and 7,5ml obtained in the first 12 hours after surgery (CTC2) were analyzed for each patient.

All patients were operated undergoing mastectomy or conservative surgery (according to the standard protocol) and sentinel lymph-node biopsy.

Sentinel nodes were localized using periareolar radioactive colloid injection technique and evaluated intraoperatively. Complete lymphadenectomy was performed in the same surgery in patients with metastasis in SLN. Sections of each lymph-node were

also analyzed through molecular analysis using Cytokeratin19 and Mammoglobin markers by RT-PCR.

The characteristics of the patients and the corresponding tumors were compiled and analysed. The results of this study were not considered in the indication of adjuvant therapies, which were indicated according to standards protocols.

CTC DETECTION

Blood was drawn into a 10 ml test tube with EDTA and cellular preservatives (Cellsave preservative tubes by Veridex™) and maintained at room temperature for a maximum of 72 hours before processing. Blood (7.5 ml) was mixed with a ferrofluid coated with specific antibodies for EpCAM (epithelial cell adhesion molecule). Isolated cells were fluorescent-stained with nucleic acid dye 4,6-diaminodino-2-phenylindole (DAPI) and labeled with monoclonal antibodies specific to leukocytes (CD45) and epithelial cell (cytokeratin 8, 18, 19) (CK-PE). They were analyzed with the Cellspotter Analyzer (Veridex™ LLC). Analysis showed cell images that were verified as CTC when they met the following criteria: round to oval morphology with a diameter of over 4 µm, cytoplasm with positive CK-PE staining and negative CD45 staining and more than 50% of the nucleus stained with DAPI inside the cytoplasm. Results are expressed as number of CTCs/7.5 ml of blood. Results were independently interpreted by five specifically trained specialists, blinded to patients' clinical characteristics.

SENTINEL LYMPH NODE AND PRIMARY TUMOR ANALYSIS

The intraoperative analysis methods for SLN evaluation included frozen section and touch imprint cytology. Histological delayed analysis on permanent section with hematoxylin and eosin stain in fixed tissue was made in 2mm sections of the whole lymph-node, which was considered the definitive diagnosis of node status.

Molecular analysis of the sentinel lymph-node involved extracting and purifying total mRNA of Cytokeratin19 (CK19) and Mammoglobin (MG) from the homogenized lymph-node section through reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), followed by measuring mRNA levels of those markers by gel electrophoresis.

Primary breast tumor was analyzed by histological conventional methods and by immunostaining for oestrogen, progesterone and HER2 receptors.

STATISTICAL METHODS

This is a prospective cohort study. Primary tumor characteristics were evaluated and correlated with CTC using Fisher exact test, Kruskal-Wallis test and Spearman correlation coefficient. The relation between CTC1 and CTC2 was assessed with the Wilcoxon Signed Rank test.

Survival curves were plotted according to the Kaplan-Meier method. Log-Rank and Breslow tests were used to detect significant differences between groups defined by

different counts of CTC. Multivariate analysis was done by the Cox proportional hazards model.

For all analyses, a p -value of $< 0, 05$ was deemed to be statistically significant. All the statistical analysis was performed using the SPSS software.

RESULTS

The median age of patients was 58 years. Conservative surgery was performed in 63% of patients whereas mastectomy in 37%. The sentinel lymph-node biopsy was positive in 10 cases (17%), in which a lymphadenectomy was intraoperatively performed. No cases of micrometastasis were found. Only one false negative case in the SLNB was observed, when analysing a clinically suspicious lymph-node during the surgery a metastasis was found, in spite of negative results of sentinel node.

The median tumor size was 17mm; 70% were T1 ($<2\text{cm}$) and 30% T2 (2-5cm) according to the TNM tumor classification.

Pre-surgery CTC detection (CTC1) was positive in the 30, 5% of the cases. Same result was obtained in post-surgery CTC detection (CTC2). Quantification of CTC yields the following results: in pre-surgery detection 5 cases (8.5%) were found to have 2 or more CTC but in no case exceed 5 CTC. In post-surgery detection (CTC2) only 2 patients (3.4%) were found to have 2 or more CTC and there was no case with 5 or more CTC.

There was no statistically significant correlation between the occurrence of CTC and other clinical or tumoral characteristics. However, the presence of either multifocal tumor, larger tumor size, axillary lymph node metastasis, HER-2 receptor or negative hormonal receptor status provides a none statistically significant increase of CTC1 (pre-surgery). As exception, there was a significant difference in the diverse histological subtypes of breast cancer and post chirurgical detection of CTC, with 37% of CTC2 detection in ductal carcinoma, 33% in lobulillar carcinoma and none case of CTC2 detection in the rest of subtypes. ($p=0,017$)

The pre and post chirurgical detection rates were concordant, identical 30.5% for CTC1 and CTC2, with a correlation of 73% in negative values and 39% in positive values. Wilcoxon and *marginal homogeneity* tests assess that there are no significant differences between CTC1 and CTC2, consequently there is no evidence that surgery produces an increase of CTC. (Wilcoxon test: $p=0.584$)

Lymph-node Citoqueratin19-Mammoglobin molecular analysis showed high concordance with an extensive histological analysis. The sensibility and specificity of CK19 analysis by RT-PCR were 40% and 98% respectively, with an area under the curve ROC (AUC) of 0.69. The sensibility/specificity of MG analysis by RT-PCR was 50/98%, with an AUC of 0.74, showing better results than CK19. Multiple-marker RT-PCR assay (CK19 and MG) showed a sensibility/specificity of 50/96% respectively; the ROC curve revealed an AUC of 0.73, which did not improve the results of the analysis of the separate markers.

The median follow-up was 35 months. Among 60 patients, 3 deaths occurred during the follow-up period. The presence of CTC before surgery demonstrated to be an independent prognostic factor, with significant relation with lower overall survival and progression-free survival ($p=0.033/p=0.033$). The presence of 2 or more CTC in the first 12 hours after surgery had a significant relation with progression-free survival, ($p=0.025$).

Univariate and multivariate analysis showed that only CTC, absence of oestrogen receptors and triple-negative subtype had significance as prognostic factor. No other tumor characteristics as axillary status, size or grade had significant relation with overall survival or progression-free survival. CTC detection before or after surgery showed, in multivariate Cox regression analysis, an strong relation with overall survival (Hazard Ratio= 4.71) and with progression-free survival (HR=5.05).

CONCLUSIONS

- The results of this study show that CTC detection is an independent prognostic factor in early breast cancer patients undergoing a sentinel lymph-node biopsy.
- There is no correlation between CTC presence and the axillary node status, analyzed by sentinel lymph-node biopsy, neither between CTC and any other prognostic factor.
- Molecular assessment of CK19 and MG through RT-PCR in sentinel nodes has high concordance with an extensive histological analysis.

- Negative Hormonal receptors and Triple Negative breast cancer subtype are found to have a correlation with overall survival and progression-free survival. Neither axillary node status nor any other tumor characteristics are found to have relation with survival.

- There is no evidence in our results that surgery significantly enhances the release of CTC into the blood circulation.

- In early breast cancer, even a single CTC detected is associated with worse overall survival and no threshold is required for considering CTC detection as positive.

- This study supports the clinical utility of CTC in very early breast cancer. Multicenter, larger studies and with more specific molecular characterization of CTC are needed in order to demonstrate the CTC clinical utility.

INTRODUCCIÓN

I. EPIDEMIOLOGIA

El cáncer de mama constituye un problema social y sanitario de primer orden ya que es el tumor maligno más frecuente y la primera causa de muerte por cáncer en la mujer. Globalmente representa el 23% del total de casos de cáncer y el 14% de los casos de muerte por cáncer, según las estimaciones de GLOBOCAN 2008. A diferencia de las décadas anteriores, es también la principal causa de muerte por cáncer en países en vías de desarrollo, por encima del cáncer de cérvix. En países occidentales, incluido España, representa la principal causa de muerte general en mujeres de 30-59 años¹. *Figura 1*.

El cáncer de mama tienen una incidencia anual en España de 15.979 nuevos casos con un intervalo de confianza, IC95% de 10,508-23,586 y una tasa acumulada de 67 por 100.000 habitantes. La tasa ajustada con relación a la Unión Europea es 66,81, inferior a la detectada en el resto de los países europeos que oscila entre un 86,14 y 115,45, dato que parece estar relacionado con un infradiagnóstico de la enfermedad en nuestro país².

La incidencia del cáncer de mama experimentó un aumento progresivo en los años 80 y 90 debido en parte a la estandarización de la mamografía como método de cribado, aumentando principalmente el diagnóstico de carcinoma in situ y estadio I mientras permanecía estable el de estadios superiores. Posteriormente, a partir de 2001, la tasa de incidencia en España se ha invertido hasta un descenso anual del 3%, probablemente debido a una saturación de los programas de cribado poblacional³.

La tasa global de mortalidad por cáncer de mama en España ha disminuido desde 1992, a un ritmo de un 2% anual. Este hecho es atribuido a los programas de detección precoz y al avance de las terapias adyuvantes. La tasa de supervivencia se sitúa por encima del 80% a los 5 años de diagnóstico. Esta disminución de la mortalidad es significativamente mayor en mujeres menores de 50 años y en tumores con receptores hormonales positivos². 0.

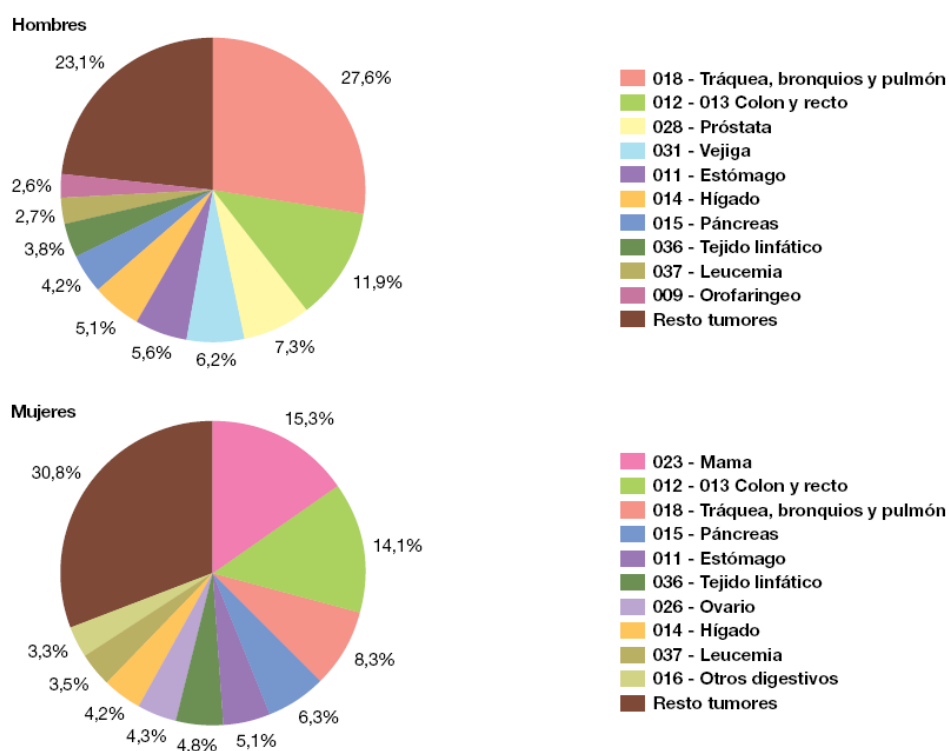


Figura 1. Mortalidad proporcional por principales localizaciones. Hombres y mujeres. Comunidad de Madrid 2006.

Fuente: Movimiento Natural de la Población. Servicio de informes de Salud y Estudios.

Mortalidad por tumor maligno de la mama de la mujer

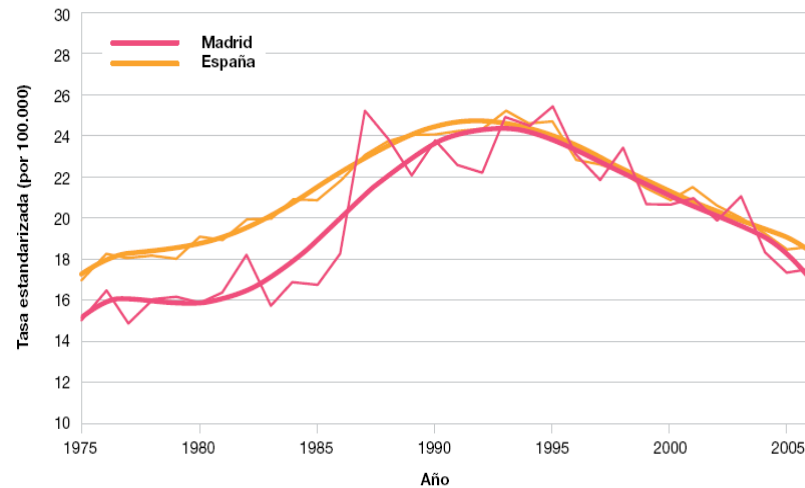


Figura 2. Tumor maligno de la mama en la mujer. Tasas de mortalidad estandarizadas por población europea, por 100mil. Comunidad de Madrid y España, 1975-2006.

Fuente: Instituto de Salud Carlos III. Servicio de informes de Salud y Estudios.

Debido a la importancia de esta enfermedad existen abundantes estudios sobre su mecanismo de acción, evolución, vías de extensión etc. A medida que se ha ido conociendo mejor la enfermedad se han ido mejorando las técnicas de diagnóstico y tratamiento para el mismo.

II. ETIOPATOGENIA

El desarrollo de un cáncer de mama se produce durante un periodo preclínico largo que incluso puede ser superior a 10 años. Aparece como resultado de la acumulación de lesiones moleculares en genes que participan en el control del crecimiento celular. La carcinogénesis es un proceso complejo en el que están implicados agentes iniciadores (inductores de alteraciones genéticas o mutágenos como radiaciones o agentes químicos) y promotores tumorales (que aumentan la proliferación celular, como hormonas o factores de crecimiento).

Por ello, en la actualidad se considera el cáncer de mama como una enfermedad sistémica, lo que tiene como consecuencia un planteamiento multidisciplinar en cuanto a su terapia.

Los factores de riesgo⁴ en el cáncer de mama, es decir, aquellos que aumentan la posibilidad de padecer la enfermedad, son importantes desde el punto de vista de la prevención (Tabla 1). Los fundamentales son la historia familiar y los factores hormonales. Su estudio permite la identificación de mujeres de alto riesgo y la posibilidad de intervenir en este riesgo, individual y socialmente.

Tabla 1. Factores de Riesgo de cáncer de mama

FACTORES DE RIESGO DE CÁNCER DE MAMA
1 Edad y sexo
2 Factores hormonales y reproductivos
- Menarquia temprana
- Menopausia tardía
- Primera gestación tras 35 años
- Nuliparidad
- Ausencia de lactancia
- Administración exógena de hormonas
3 Enfermedad benigna de la mama
4 Antecedentes personales de cáncer de mama
5 Factores ambientales y geográficos
6 Factores Dietéticos: Alcohol, dieta rica en grasas y proteínas
7 Antecedentes familiares

II.A. FACTORES DE RIESGO DE CÁNCER DE MAMA

II.A.1 Edad y sexo

Son los factores de riesgo más fuertes de cáncer de mama. Así, este cáncer es 100 veces más frecuente en mujeres que en hombres¹.

La incidencia del cáncer de mama aumenta con la edad. Presenta un pico entre los 45-55 años, coincidente con la edad de la menopausia, lo cual se debe a la influencia hormonal que sufre este tipo de cáncer. A partir de los 75-80 años la curva de incidencia queda prácticamente plana e incluso decrece¹. *Figura 3.*

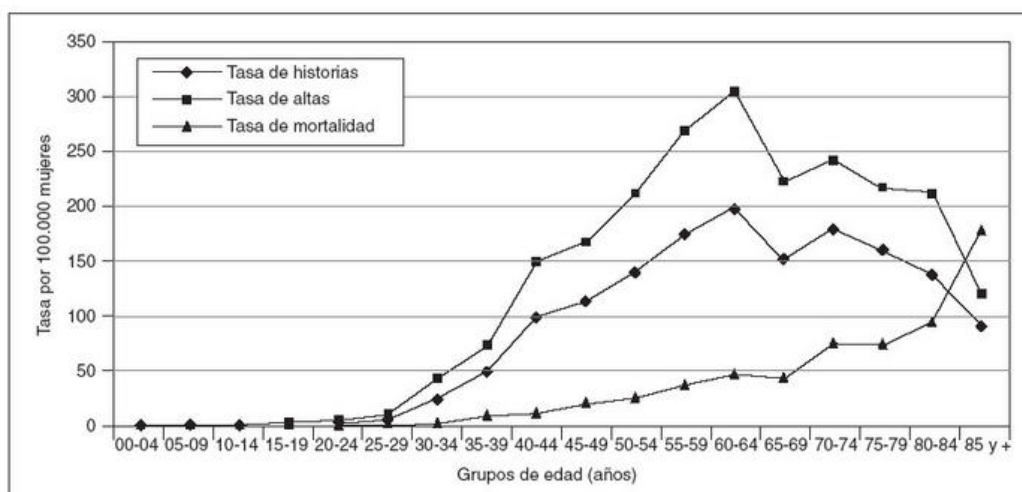


Figura 3. Tasas de incidencia, hospitalización y mortalidad por cáncer de mama según edad. Extremadura 2002-2004.5

II.A.2 Factores reproductivos y hormonales

El riesgo de cáncer de mama está influido por una exposición prolongada a las hormonas sexuales durante los años reproductivos, como ocurre en los procesos fisiológicos que se citan a continuación.

II.A.2.1 Menarquia precoz

Está demostrado que la aparición temprana de los ciclos menstruales, que trae como consecuencia niveles elevados de estrógenos durante más años, es un factor de riesgo para cáncer de mama. Aquellas mujeres que presentan menarquia antes de los 12 años tienen un 23% más de riesgo que aquellas que la presentan después de los 15 años⁶.

II.A.2.2 *Menopausia tardía*

El riesgo que presentan las mujeres con menopausia por encima de la edad de 55 años es dos veces mayor que el que presentan mujeres en las que la menopausia se dio a los 45 años o antes⁶.

La menopausia artificial tiene un efecto protector directamente relacionado con la edad en que se produce. Antes de los 35 años, una ooforectomía puede conferir un 64% de protección, la cual disminuye conforme aumenta la edad en la que se realiza la cirugía. Comparando el efecto protector de la menopausia natural y artificial, se determinó que la ooforectomía bilateral estaba asociada a un menor riesgo que la menopausia natural a la misma edad, posiblemente como resultado del descenso rápido y completo de los niveles hormonales endógenos en el caso de la ooforectomía⁷.

II.A.2.3 *Edad del primer embarazo a término*

Diferentes estudios observan que las mujeres con el primer embarazo a término antes de los 20 años están expuestas a la mitad de riesgo que las mujeres sin hijos, y éstas a su vez tienen menor riesgo que las que tuvieron su primera gestación a término después de los 35 años. Estas últimas tienen aproximadamente 5 veces más riesgo que las de primer grupo⁸.

Esta asociación es independiente del número de embarazos y de otros factores de riesgo y se explica porque durante el primer embarazo a término tiene lugar la

diferenciación del tejido mamario, vía fundamental de protección. Sin embargo, cuando el embarazo ocurre después de los 35 años, existen más posibilidades de que exista una lesión precancerosa y el elevado nivel hormonal durante la gestación actúa como estímulo de crecimiento.

II.A.2.4 Número de Embarazos

Según la mayoría de los estudios, las mujeres nulíparas tienen un riesgo de cáncer de mama de 1.2 a 1.7 veces mayor que aquellas que han tenido algún hijo y este efecto protector aumenta con el número de hijos.^{9, 10} Sin embargo este efecto protector no se ve hasta 10 años después del parto. Existen estudios que describen que esta protección se da sólo en los cánceres de aparición posterior a los 50 años mientras que antes de esa edad las nulíparas no presentarían un mayor riesgo¹¹.

II.A.2.5 Lactancia

Se ha descrito un efecto protector de la lactancia respecto al cáncer de mama, dependiente de la duración de la misma. El efecto protector será mayor durante la premenopausia y en mujeres con un familiar de primer grado afectado.^{12,13}

Un metaanálisis que incluye 47 estudios epidemiológicos con un total de 50.302 mujeres afectadas de cáncer de mama y 96.973 controles estimó que el riesgo relativo de cáncer de mama se reducía un 4,3% para cada 12 meses de lactancia.¹⁴

El mecanismo de este efecto pudiera ser la ausencia de ciclos ovulatorios en este periodo o el aumento de prolactina junto a descenso estrogénico.

II.A.2.6 *Administración exógena de hormonas*

Anticonceptivos orales:

Existen abundantes estudios sobre la posible asociación entre anticonceptivos orales y cáncer de mama, algunos de ellos con resultado de pequeño aumento de riesgo relativo. Sin embargo, en la actualidad no hay datos suficientes como para poder considerar que en general el uso de contraceptivos orales aumenta el riesgo de cáncer de mama¹⁵.

Terapia Hormonal:

El estudio WHI (Women's Health Initiative) demostró por primera vez la relación entre la terapia hormonal sustitutiva y cáncer de mama¹⁶. En la actualidad hay evidencia científica de que únicamente el uso en la menopausia de terapia hormonal sustitutiva combinada (estrógenos + progestágenos) durante un largo periodo de tiempo aumenta el riesgo relativo de cáncer de mama, predominantemente aquel hormonodependiente. Sin embargo, su uso durante un periodo menor no aumenta el riesgo de forma significativa. Por otro lado, el uso de terapia únicamente con estrógenos está asociado con un menor riesgo relativo para cáncer de mama¹⁷.

II.A.3 Antecedentes personales de enfermedad benigna de la mama

Las enfermedades benignas de la mama incluyen un gran espectro de entidades anatomopatológicas. Las lesiones de tipo no proliferativo como el fibroadenoma, el papiloma único o la mastopatía fibroquística, no están asociados a un aumento de riesgo de cáncer de mama. Sin embargo, aquellas pacientes con diagnóstico de una lesión proliferativa sin atipia celular presentan un aumento de riesgo (riesgo relativo de 1,3-2), como en el caso de los fibroadenomas complejos, la hiperplasia moderada o severa, la adenosis esclerosante o los papilomas múltiples. Y éste es mayor ante lesiones con atipia (riesgo relativo de 4-6) como la hiperplasia ductal o lobulillar atípica¹⁸.

II.A.4 Antecedentes personales de cáncer de mama

El antecedente personal de cáncer de mama aumenta el riesgo de desarrollar un cáncer en la mama contralateral. Este aumento de riesgo es del 5% en 10 años en los casos de carcinoma in situ previo y de 0,5-1% al año en pacientes con diagnóstico de cáncer de mama invasivo previo⁴.

II.A.5 Factores socioeconómicos y geográficos

En el mundo se observan grandes variaciones en la incidencia del cáncer de mama, mayor en los países industrializados con respecto a la incidencia descrita en Asia, Centroamérica y África. Las mujeres con nivel socioeconómico alto presentan mayor riesgo de cáncer de mama.

Ambos factores podrían explicarse por la diferencia en el patrón reproductivo, de lactancia y en la dieta¹⁹.

II.A.6 Factores dietéticos

La distribución geográfica en la incidencia del cáncer de mama y los cambios en la población inmigrante hacen pensar en una influencia de factores ambientales.

Se han estudiado ampliamente diferentes hábitos dietéticos como posibles factores de riesgo de cáncer de mama. No hay resultados definitivos en cuanto a la influencia de ingesta de grasas en el riesgo de padecer cáncer de mama. En cambio, sí se han obtenido resultados concluyentes en cuanto a un aumento de riesgo de cáncer de mama de tipo hormonodependiente asociado tanto a la ingesta de carne roja como a la de alcohol. Los datos más concluyentes relacionan aumento de riesgo de cáncer de mama con alto índice de masa corporal (IMC) y con aumento de peso en la postmenopausia²⁰.

II.A.7 Factores familiares y genéticos

Presentar antecedentes familiares de cáncer de mama es un factor de riesgo importante para el desarrollo del mismo, sin embargo, sólo el 15-20% de las pacientes afectadas tienen historia familiar de cáncer de mama. La presencia de cáncer de mama aparece con mayor frecuencia en ciertas familias y esto puede deberse a factores genéticos primarios pero también al azar o a factores ambientales comunes.

El grado de aumento de riesgo depende del número de familiares de primer grado afectado y de la edad del familiar afectado en el momento del diagnóstico. Es decir, el riesgo relativo aumenta a menor edad del familiar en el momento en el que se le diagnosticó el cáncer, principalmente si este diagnóstico fue durante la premenopausia.

Por otro lado, sólo un 5-6% de los cánceres de mama son directamente atribuibles a herencia genética por mutaciones de genes específicos como BRCA 1, BRCA2, escasamente dependientes de factores ambientales²¹.

III. DIAGNOSTICO Y CLASIFICACION

Con el fin de realizar el diagnóstico en la etapa más precoz de la enfermedad, se lleva a cabo un cribado mamográfico poblacional, gracias al cual en la actualidad una gran cantidad de los cánceres de mama se detectan en la etapa preclínica.

Aun así, la causa más frecuente por la que se llega al diagnóstico de cáncer de mama es por un nódulo palpable detectado por la propia paciente.

Por otro lado, al menos el 20% de los cánceres de mama no son detectables por mamografía por lo que todo nódulo sospechoso debe ser biopsiado independientemente del resultado de los estudios de imagen.

Ante la sospecha de un cáncer de mama, es preciso obtener un diagnóstico anatomopatológico de certeza. El objetivo es utilizar la técnica menos invasiva con la que se pueda obtener material diagnóstico y así evitar cirugías innecesarias. Las técnicas utilizadas son:

- *Punción-aspiración con aguja fina (PAAF).*
- *Biopsia con aguja gruesa (BAG).*
- *Biopsia asistida por vacío (BAV).*
- *Biopsia quirúrgica*

Las tres primeras pueden realizarse con ayuda de ecografía o estereotaxia, (imagen mamográfica guiada por coordenadas) según la técnica de imagen más sencilla en la que el tumor sea detectable.

La biopsia quirúrgica es la resección de la lesión sospechosa en parte o en su totalidad; puede ser necesario un marcaje previo con arpón o radioisótopo para su detección en quirófano.

El diagnóstico anatomopatológico debe informar de la invasión, del tipo tumoral y del estado inmunohistoquímico del tumor (estado de receptores hormonales y HER2 o Receptor 2 del Factor de Crecimiento Endodérmico), para lo cual es necesario un estudio histológico de la muestra. Se debe tener en cuenta que la punción aspiración con aguja fina da información únicamente citológica, insuficiente para obtener diagnóstico prequirúrgico completo, por lo que no se recomienda en lesiones sospechosas.

Una vez diagnosticado, es preciso determinar el estadio del tumor y realizar un estudio de extensión: salvo en presencia de metástasis, la elección del tipo de tratamiento inicial (tipo de cirugía o tratamiento sistémico) depende del tamaño tumoral y de la presencia de afectación axilar clínica o ecográfica. Sin embargo, el estadio definitivo se concluirá tras los resultados anatomopatológicos postquirúrgicos, que dictan el pronóstico y el tratamiento adyuvante.

La clasificación más utilizada para el cáncer de mama es el TNM (del inglés Tumor, Nodes, Metástasis), que tiene en cuenta el tamaño tumoral (T), el estado de los

ganglios axilares (N) y la presencia de metástasis a distancia (M), como se muestra en la Tabla 2. Basado en esta clasificación se definen unos Estadios de cáncer de mama.

Esta clasificación se muestra en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2. Definiciones del TNM en el cáncer de mama

TNM
TUMOR PRIMARIO (T)
T_x Tumor primario que no puede ser evaluado
T₀ Sin evidencia de tumor primario
T_{is} Carcinoma <i>in situ</i> , carcinoma ductal <i>in situ</i> , carcinoma lobelar <i>in situ</i> , o enfermedad de Paget del pezón sin tumor asociado. [Nota: la enfermedad de Paget asociada a un tumor se clasifica de acuerdo con la medida del tumor.]
T₁ Tumor de 2,0 cm o menos en la mayor dimensión
T _{1mic} Microinvasión 0,1 cm o menos en la mayor dimensión
T _{1a} Tumor de más de 0,1 cm pero no más de 0,5cm en la mayor dimensión
T _{1b} Tumor de más de 0,5 cm pero no más de 1,0cm en la mayor dimensión
T _{1c} Tumor de más de 1,0 cm pero no más de 2,0cm en la mayor dimensión
T₂ Tumor de más de 2,0 cm pero no más de 5,0cm en la mayor dimensión
T₃ Tumor de más de 5,0 cm en la mayor dimensión
T₄ Tumor de cualquier medida con extensión directa a: a) pared torácica o b) piel, sólo como se describe más adelante.
T _{4a} Extensión a pared torácica, sin incluir el músculo pectoral
T _{4b} Edema (incluye piel de naranja) o ulceración de la piel de la mama o nódulos cutáneos satélites confinados en la misma mama
T _{4c} T _{4a} y T _{4b} a la vez
T _{4d} Carcinoma inflamatorio
GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (N)
N_x Ganglios linfáticos regionales que no puedan ser evaluados (p. ej., previamente resecados)
N₀ Sin metástasis en los ganglios linfáticos regionales
N₁ Metástasis en el/los ganglio/s linfático/s axilar movable ipsilateral
N₂ Metástasis en los ganglios linfáticos axilares ipsilaterales fijos o agrupados, o en los ganglios de la mama interna ipsilateral por imagen en ausencia de metástasis clínicas en los ganglios linfáticos axilares
N _{2a} Metástasis en los ganglios linfáticos axilares ipsilaterales agrupados o fijos a otras estructuras
N _{2b} Metástasis sólo en los ganglios de la mama interna ipsilateral por imagen y en ausencia de metástasis clínicas en los ganglios linfáticos axilares
N₃ Metástasis en los ganglios linfáticos infraclaviculares ipsilaterales con o sin afectación de los ganglios linfáticos axilares, o en los ganglios de la mama interna ipsilateral por imagen y en presencia de metástasis clínicas en los ganglios linfáticos axilares; o metástasis en los ganglios linfáticos supraclaviculares ipsilaterales con o sin afectación de los ganglios linfáticos axilares o de la cadena mamaria interna.
N _{3a} Metástasis en los ganglios linfáticos infraclaviculares ipsilaterales con afectación de los ganglios linfáticos axilares
N _{3b} Metástasis en los ganglios linfáticos de la cadena mamaria interna ipsilaterales con afectación de los ganglios linfáticos axilares
N _{3c} Metástasis en los ganglios linfáticos supraclaviculares ipsilaterales
METÁSTASIS A DISTANCIA (M)
M_x Metástasis a distancia que no pueden ser evaluadas
M₀ Sin metástasis a distancia
M₁ Metástasis a distancia

Tabla 3. Agrupación por estadios

Estadios		
Estadio 0		Tis N0 M0
Estadio I		T1 N0 M0
Estadio II	Estadio IIA:	T0 N1 M0
		T1 N1 M0
		T2 N0 M0
	Estadio IIB:	T2 N1 M0
		T3 N0 M0
		T0 N2 M0
Estadio III	Estadio IIIA:	T1 N2 M0
		T2 N2 M0
		T3 N1 M0
		T3 N2 M0
	Estadio IIIB:	T4 N0 M0
		T4 N1 M0
		T4 N2 M0
	Estadio IIIC	Cualquier T N3 M0
Estadio IV		Cualquier T Cualquier N M1

IV. ANATOMÍA PATOLÓGICA

La glándula mamaria está compuesta por lóbulos y conductos. Cada mama tiene entre 15 y 20 lóbulos, constituidos por un conducto galactóforo principal que se ramifica en conductos segmentarios y, a su vez, éstos en conductillos terminales que se abren en dilataciones saculares o acinos. Cada conducto terminal con sus acinos forma una unidad lobulillar ductal terminal.

El 95% de las enfermedades malignas de la mama se originan en el tejido epitelial y son por tanto carcinomas²². Representa un grupo de lesiones diferentes tanto microscópicamente como en cuanto a su comportamiento, aunque se considera una misma enfermedad.

En la mayoría de los casos, el carcinoma mamario se desarrolla en el epitelio ductal que reviste los conductos extralobulillares de mediano y grueso calibre (carcinoma ductal) y, de forma menos frecuente, en el epitelio acinar que forma los lobulillos (carcinoma lobulillar)²³. Estos son los dos tipos histológicos principales de tumores, aunque existen otros menos frecuentes como el papilar o medular y los tumores no epiteliales como linfomas o sarcomas.

Comparando los dos subtipos tumorales más frecuentes, el carcinoma lobulillar infiltrante tiene mayor tendencia a la multicentricidad y bilateralidad, a estar más diferenciado, a ser homono-receptor positivo, a afectar a mujeres de mayor edad y a metastatizar en etapas más tardías y en localizaciones inusuales²⁴.

Tabla 4. Subtipos histológicos de carcinomas mamarios y porcentajes²²

SUBTIPO HISTOLOGICO	Frecuencia
Ductal Infiltrante	76%
Lobulillar infiltrante	8%
Ductal/Lobulillar	7%
Mucinoso	2,4%
Tubular	1,5%
Medular	1,2 %
Papilar	1%
Otros	5%

En cuanto al grado de invasión, los tumores se dividen en infiltrantes o no infiltrantes. Los tumores no infiltrantes o carcinoma in situ, son aquellos que derivan del epitelio y se encuentran confinados en la luz de los ductos o en los lóbulos, sin que exista invasión del estroma a través de la membrana basal. El carcinoma ductal infiltrante se clasifica también en grado I, II o III según la diferenciación celular y el número de mitosis.

El cáncer de mama además se puede clasificar en subtipos biológicos que presentan diferentes comportamientos y respuestas al tratamiento. En base a los perfiles de expresión genética, se ha descrito una clasificación por subtipos moleculares²⁵:

Subtipos Luminales: Dividido en Luminal A y B. Presentan expresión genética similar al epitelio luminal de la mama; expresan citokeratina 8 y 18. Son los subtipos más frecuentes y en su mayoría presentan fenotipo de receptores hormonales positivos.

Subtipo HER2: Representa el 10-15% de los cánceres de mama, se caracteriza por la expresión de clusters génicos de Factor de Crecimiento Epidérmico 2 (HER2) y baja expresión de genes luminales y basales. Solo la mitad de los cánceres considerados

como HER2+ clínicamente pertenecen a este grupo, el resto pueden pertenecer a subtipos luminales con HER2 positivo o a otros subtipos moleculares.

Subtipos basales: La mayoría de estos tumores pertenecen a la categoría clínica de triples negativos (receptores de estrógenos, progesterona y HER2 negativos)

V. TRATAMIENTO

El cáncer de mama se puede dividir, con respecto al tratamiento, en carcinoma operable, carcinoma localmente avanzado (no operable de manera primaria) y carcinoma metastático.

El tratamiento del cáncer de mama en estadios iniciales tiene como fin obtener la curación, o al menos, la mayor supervivencia posible sin recaídas de la paciente, procurando al mismo tiempo la menor afectación funcional, estética y de calidad de vida. Incluye el tratamiento de la enfermedad local con cirugía, combinada con radioterapia si estuviera indicado, y posterior tratamiento de la enfermedad sistémica con quimioterapia, hormonoterapia, terapia biológica o combinación de éstas.

Los hallazgos quirúrgicos determinan el estadio del cáncer, lo que constituye la información fundamental en el dictamen del pronóstico y de la necesidad de terapias adyuvantes.

La aplicación de terapias sistémicas adyuvantes ha reducido significativamente la mortalidad del cáncer de mama. No obstante, existe un porcentaje no desdeñable de pacientes con enfermedad de buen pronóstico que no va a recidivar, las cuales están recibiendo tratamiento quimioterápico que realmente no necesitarían, por lo que están sufriendo así efectos secundarios innecesarios. En los últimos años se han realizado numerosos estudios para discernir aquellas pacientes a las que el tratamiento adyuvante les

producirá un beneficio de aquellas a las que no, por lo que podrían ahorrarse la toxicidad que éste provoca sin aumentar el riesgo de recidiva.

La información y toma de decisiones en consenso con la paciente es importante ya que sus prioridades deberán tenerse en cuenta, principalmente en situaciones en las que hay varias opciones terapéuticas con tasas de supervivencia equiparables.

Las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama en estadios iniciales tienen indicación de tratamiento quirúrgico como primera medida terapéutica. Posteriormente se valorará el tratamiento radioterápico y/o sistémico según los factores pronósticos y predictivos.

V.A. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

El tratamiento quirúrgico del cáncer de mama ha cambiado drásticamente en los últimos 20 años. Se ha evolucionado hacia una cirugía cada vez más conservadora al mismo tiempo que es complementada con otros tratamientos. El objetivo es preservar la anatomía de la paciente sin disminuir la supervivencia.

V.A.1 Cirugía de la mama: mastectomía/ cirugía conservadora²⁶**V.A.1.1 Cirugía conservadora:**

Consiste en realizar la exéresis del tumor sin reseca excesivo tejido sano, precisa radioterapia posterior de la mama para erradicar la enfermedad residual microscópica que pudiera existir. Está demostrada una equivalencia en la supervivencia tras tratamiento quirúrgico conservador más radioterapia o tras mastectomía²⁷ siempre y cuando se cumplan los criterios de inclusión. Presenta, no obstante, mayores tasas de recidiva local a cambio de mejores resultados estéticos.

La cirugía conservadora tiene, sin embargo, sus contraindicaciones, sólo es aplicable en el 60-75% de los pacientes ya que no se recomienda si el riesgo de recurrencia es mayor del 10-15 % en los primeros 5-10 años tras diagnóstico; esto se da en los casos que se describen en la Tabla 5.

Tabla 5. *Contraindicaciones de cirugía conservadora*

Contraindicaciones Absolutas	Contraindicaciones Relativas
- Persistencia de márgenes afectos tras re-escisión razonable.	- Enfermedades del tejido conectivo. Por posibles complicaciones cutáneas tras radioterapia.
- Enfermedad multicéntrica: dos o más focos de carcinoma que afectan a más de un cuadrante de la mama.	- Relación tumor/ mama: que impida la resección con resultados estéticos adecuados.
- Microcalcificaciones sospechosas difusas en mamografía que sugieran multicentricidad.	
- Contraindicación de radioterapia o radioterapia previa en la zona.	
- Embarazo (aunque es valorable su realización con tratamiento radioterápico tras parto).	

V.A.1.2 *Mastectomía:*

La evolución en el tratamiento del cáncer de mama ha ido modificando la técnica de la mastectomía para hacerla cada vez menos agresiva. En la actualidad se realiza mastectomía tipo Madden modificada, en la que se reseca la glándula mamaria junto al complejo areola pezón y la fascia del pectoral mayor, respetando éste último. Está indicada en casos de contraindicación de cirugía conservadora y si la paciente lo desea por motivos psicológicos. En estos casos deberá evaluarse la indicación de reconstrucción plástica de la mama de forma inmediata o diferida.

V.A.2 Manejo de los ganglios axilares

El estado de los ganglios axilares es, hasta ahora, el factor pronóstico más importante en el cáncer de mama localizado. Su exéresis en caso de afectación tiene impacto en el control de la enfermedad, tanto en cuanto a la recurrencia axilar como a la supervivencia global y, por último, es un indicador de la necesidad de tratamiento quimioterápico adyuvante. Tiene, por tanto, gran importancia tanto a nivel terapéutico como pronóstico.^{28,29,30}

Por todo ello, tradicionalmente se realizaba linfadenectomía axilar de forma rutinaria en la cirugía del cáncer de mama operable. Sin embargo, ésta presenta importantes efectos secundarios tales como trombosis de la vena axilar, afectación de nervios motores o sensitivos, linfedema, seroma y afectación funcional del hombro.

La linfadenectomía continúa siendo necesaria en aquellas pacientes con sospecha de afectación axilar clínica o ecográfica, confirmada por medio de punción-aspiración con aguja fina (PAAF). Sin embargo, las pacientes con axila negativa por medios clínicos se beneficiarán de una técnica de estadificación axilar de mucha menor morbilidad: la biopsia del ganglio centinela (BGC).

V.A.3 Biopsia de ganglio centinela

Las células tumorales migran desde el tumor primario vía linfática siguiendo un orden fijo, principalmente hacia la axila, y desde allí se diseminan al resto del cuerpo siendo así capaces de producir metástasis. La inyección intradérmica, peritumoral o periareolar de un material identificable (por tinción o un coloide radioactivo), permite identificar intraoperatoriamente el primer o los primeros ganglios de drenaje linfático de la mama.

La ausencia de enfermedad en este primer ganglio o ganglios centinela predice la ausencia de enfermedad en el resto de ganglios axilares (valor predictivo negativo de hasta un 96%) evitando realizar la linfadenectomía axilar y reduciendo por tanto la morbilidad del tratamiento³¹. En la actualidad la biopsia de ganglio centinela es el método de elección en el manejo de los ganglios axilares en pacientes sin sospecha de afectación axilar³².

La técnica del ganglio centinela presenta en principio una tasa de falsos negativos de un 5-10% aunque los últimos estudios en centros con experiencia alcanzan tasas significativamente menores³³.

V.A.3.1 *Indicaciones de biopsia de ganglio centinela*

- Debe realizarse, como técnica de elección, en pacientes con diagnóstico de cáncer de mama infiltrante T1, T2 o microinfiltrante y sin sospecha de afectación axilar (en la exploración o ecografía axilar) o tras biopsia con aguja fina negativa de ganglio axilar.

- Podría omitirse en los casos en los que el estado de los ganglios axilares no afecte a las decisiones en cuanto al tratamiento adyuvante. Este es el caso de pacientes mayores de 80 años con un tamaño tumoral menor de 2cm.

- Está indicado ante el diagnóstico de carcinoma in situ que precisa mastectomía, ya que si el resultado definitivo de la anatomía patológica es de carcinoma infiltrante, no sería posible realizar la biopsia de ganglio centinela tras la mastectomía.

- Las restricciones en la indicación de BGC son menores según evoluciona su estudio en casos determinados; la actualización de recomendaciones para la realización de biopsia de ganglio centinela de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria son las expuestas en la tabla 5.³⁴ En ella, algunas de las situaciones clínicas consideradas como no aceptadas de manera rutinaria, se realizan como parte de estudios clínicos o casos excepcionales.

Tabla 6. Recomendaciones de la Sociedad Española de Senología y Patología mamaria para la realización de Biopsia de Ganglio Centinela.

Circunstancia clínica	Recomendación
Tumores T1 o T2	Aceptada
Tumores T3 o T4	No recomendada
Tumores multicéntricos	Aceptada
Cáncer de mama inflamatorio	No recomendada
Carcinoma ductal in situ tratado mediante cirugía conservadora	No recomendada, salvo tumores >5cm con sospecha de microinvasión
Carcinoma ductal in situ tratado mediante mastectomía	Aceptada
Adenopatías axilares palpables	No recomendada
Pacientes ancianas	Aceptada
Obesidad	Aceptada
Cáncer de mama del varón	Aceptada
Embarazo	Aceptada*
Evaluación de adenopatías en cadena mamaria interna	Aceptada
Biopsia previa (diagnóstica o excisional)	Aceptada
Cirugía axilar previa	Individualizar casos*
Cirugía mamaria previa no oncológica (reconstrucción mamaria, reducción o aumento de volumen)	Aceptada*
Tras tratamiento sistémico primario	Dentro de ensayos clínicos*
Previo a tratamiento sistémico primario	Aceptada

* Cambios en las últimas actualizaciones, Consenso de Valencia 2010.

V.A.3.2 Carga tumoral.

La cantidad de masa tumoral presente en el ganglio centinela se clasificará en:

1. Células tumorales aisladas: Hallazgo de acúmulos de células tumorales menores de 0,2mm o menos de 200 células dispersas en el único corte histológico estudiado durante la biopsia intraoperatoria. Su presencia no afecta a la supervivencia global ni a la supervivencia libre de enfermedad³⁵. Se considera como ganglio centinela negativo (N0(i+) en clasificación TNM), sin afectación ganglionar; por tanto, no implica indicación de linfadenectomía y no cambia la indicación de tratamiento sistémico ni radioterápico adyuvante.

2. Micrometástasis: Hallazgo de metástasis ganglionar mayor de 0,2mm pero menor de 2mm en el corte histológico. El manejo de estos casos es controvertido ya que existen estudios que demuestran una reducción de la supervivencia con respecto a aquellas pacientes sin afectación ganglionar³⁶, mientras que hay otros que muestran que esta reducción es mínima o incluso nula³⁷. Se considera ganglio centinela positivo (N1(mi+) en la clasificación TNM) en cuanto a la indicación de terapias sistémicas, y está asociado con la presencia de metástasis en ganglios no centinela. A pesar de ello, el incremento de riesgo de recidiva local en los casos en los que se indica la no realización de linfadenectomía es bajo, y, si además se lleva a cabo irradiación axilar, este incremento es casi inexistente (0,3%)³⁸. En general las principales guías quirúrgicas (American Society of Clinical Oncology, ASCO³², National Comprehensive Cancer Network NCCN³⁹) hasta

hace unos años recomendaban la realización de linfadenectomía pero en la actualidad hay datos suficientes para no llevarla a cabo en determinados casos³⁸.

3. Macrometástasis: Afectación tumoral mayor de 2mm en el ganglio centinela; está indicada la linfadenectomía axilar. No obstante, esta indicación está siendo sujeto de estudio en pacientes con menos de 3 ganglios centinela positivos, como se detalla a continuación.

V.A.3.3 *Indicación de linfadenectomía tras Biopsia de Ganglio Centinela*³⁹

- No está indicada en los casos de BGC negativo, ni en los casos en que sólo se objetivan células tumorales aisladas.

- Está indicada ante el hallazgo de macrometástasis en 3 o más ganglios centinela detectados por hematoxilina-eosina.

- Está indicada cuando la técnica de ganglio centinela no tiene éxito, o en caso de identificar un ganglio no centinela sospechoso durante la técnica de BGC.

- Las guías de manejo clínico hasta ahora utilizadas en la práctica diaria recomiendan en general linfadenectomía también ante el hallazgo de un solo ganglio centinela afectado.

- Sin embargo sólo el 48% de las pacientes con afectación del ganglio centinela presentará afectación en algún otro ganglio axilar una vez realizada la linfadenectomía³² y únicamente del 20 al 30% en el caso de hallazgo de micrometástasis. Por ello se ha comenzado a investigar la posibilidad de que no sea necesaria la linfadenectomía en determinadas pacientes con afectación de menos de tres ganglios centinelas⁴⁰ ya que la determinación de la afectación del ganglio centinela sería útil como factor predictivo (se determina con ello la necesidad de terapia sistémica), pero el riesgo de recidiva axilar es escasa^{41,42,43,44}.

Por esto último, para discernir aquellas pacientes en las que la linfadenectomía no sería necesaria una vez realizada de BGC, están en desarrollo unos “nomogramas de predicción” que incluyen características clínicas y anatomopatológicas⁴⁵.

Además, Giuliano y colaboradores, en un ensayo simple aleatorizado realizado a pacientes con cáncer de mama T1 o T2 con menos de 3 ganglios centinela positivos, tratamiento con cirugía conservadora e irradiación total de la mama, comparó la evolución de aquellas a las que se había realizado linfadenectomía con las que, a pesar ganglio centinela positivo, no se les realizaba linfadenectomía. No se observaron diferencias en la supervivencia, salvo en las pacientes con ausencia de receptores estrogénicos, menores de 50 años y sin tratamiento sistémico adyuvante⁴⁶.

A la vista de estos resultados, se están llevando a cabo dos estudios clínicos randomizados con el objetivo de valorar el beneficio de la linfadenectomía axilar en pacientes sin afectación axilar clínica con ganglio centinela positivo para malignidad

(EORTC 10981-22023 AMAROS⁴⁷ y 23-01 IBCSG⁴⁸). En espera de los resultados definitivos, se acepta en el manejo de estas pacientes realizar linfadenectomía en todos los casos de ganglio centinela positivo u omitir ésta en los casos de mujeres con cáncer de mama de menor riesgo de recidiva (como mujeres con cáncer de mama T1 o T2 a las que se les ha indicado radioterapia, con receptores hormonales positivos). En la última revisión de las guías NCCN ya se propone como posibilidad la no realización de linfadenectomía en estos casos³⁹.

V.A.3.4 Estudio Histológico del Ganglio centinela

El estudio anatomopatológico del ganglio centinela se realiza inicialmente con la técnica de hematoxilina-eosina: Consiste en examinar, de manera intraoperatoria, uno o más cortes congelados de cada ganglio a los que se les aplica dicha tinción. El análisis histológico intraoperatorio del ganglio centinela es fundamental para poder completar la linfadenectomía en el mismo acto quirúrgico si los resultados fueran positivos.

El estudio histológico con hematoxilina-eosina es el considerado “patrón oro” en la detección de metástasis del ganglio centinela, es el que se utilizó como referencia los estudios clínicos aleatorizados que demostraron la utilidad de la técnica de ganglio centinela⁴⁹ y el recomendado aun en la actualidad por la NCCN para la toma de decisiones.

Sin embargo, los métodos histológicos tienen sus limitaciones: no existe un protocolo estandarizado para este examen y está sujeto a una disparidad subjetiva según el patólogo.

Por otro lado, el estudio intraoperatorio implica otra serie de limitaciones: la escasa muestra de tejido estudiado, la menor calidad en el tejido congelado, el tiempo limitado del patólogo para dar un resultado y la escasa sensibilidad de la técnica a las metástasis de cáncer lobulillar. Todo ello incrementa la tasa de falsos negativos de la técnica.

La búsqueda de técnicas estandarizadas, con alta sensibilidad, que permitan resultados objetivos, reproducibles y que al mismo tiempo se puedan realizar en corto espacio de tiempo, ha llevado a desarrollar nuevas técnicas que perfeccionen los métodos clásicos, como describimos en los apartados siguientes.

V.A.3.5 *Técnicas de inmunohistoquímica*

Detectan antígenos producidos por las células tumorales mediante anticuerpos marcados con partículas fluorescentes, diferenciándolos así de las células ganglionares normales, pueden detectarse varios tipos de antígenos, como marcadores genómicos (HER2-neu, gen p53, ciclina D1, Oncogen RAS, Oncogen c.myc, encogen Bcl-2) receptores hormonales, Catepsina-D, Cadherina-E, etc.

Su uso incrementa la detección de micrometástasis y células metastásicas aisladas⁵⁰. Sin embargo, en los estudios realizados sobre la relevancia clínica de un

resultado negativo para hematoxilina-eosina y positivo por inmunohistoquímica en ganglio centinela, no se encuentra diferencia significativa en la supervivencia⁵¹. Por ello las guías clínicas (National Comprehensive Cancer Network, NCCN) no recomiendan realizar de rutina esta técnica sino reservarla para los casos en que la hematoxilina-eosina no es concluyente.

V.A.3.6 *Estudio Molecular: Técnica de Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) en el ganglio centinela*

Consiste en realizar un diagnóstico molecular de metástasis ganglionares por medio de la amplificación de ARN mensajero de diferentes marcadores de expresión de genes presentes en células epiteliales, las cuales forman parte del tejido mamario normal y tumoral pero no de tejido ganglionar.

La ampliación del ARN mensajero se hace mediante reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR), posteriormente éste se detecta por electroforesis en la RT-PCR convencional o por fluorescencia en la RT-PCR a tiempo real.

Inicialmente se estudió cuáles podrían ser los marcadores moleculares más adecuados para identificar metástasis.

Schoenfeld⁵² y colaboradores describió en 1994 que la citoqueratina 19 era un buen discriminador entre ganglio con y ganglio sin metástasis, con mayor sensibilidad que la inmunohistoquímica.

Otros marcadores estudiados son MUC-1 (mucina implicada en la adhesión celular), CEA (antígeno carcinoembrionario, marcador tumoral), Maspin (inhibidor de proteasa sérica mamaria) y VEGF (factor de crecimiento de endotelio vascular).

Los marcadores más estudiados son la citoqueratina 19 y la mamoglobina, ésta se expresa en las células epiteliales de la mama y en el 80-95% de los tumores mamarios; su detección en ganglio centinela presenta la mejor combinación sensibilidad/ especificidad, con una sensibilidad de 88% y una especificidad de 77%, aunque disminuyen en los tumores muy pobremente diferenciados⁵³.

Posteriormente se estudiaron las diferentes combinaciones de marcadores para mejorar la sensibilidad y especificidad de la técnica, diversos estudios demuestran que la detección de varios genes complementarios aumenta la sensibilidad de la técnica debido a la heterogeneidad del cáncer de mama⁵³.

Estos estudios iniciales coincidieron en que el análisis molecular otorgaba mayor sensibilidad en el estudio del ganglio centinela que el análisis histológico, sin embargo se observó un exceso de resultados falsos positivos, según el nivel de expresión génica que se eligiera como punto de corte, e incluso podía detectar expresión génica en pacientes sin cáncer de mama⁵⁴.

La introducción de la técnica de RT-PCR en tiempo real mejora los resultados del estudio molecular del ganglio centinela. En un estudio en el que se analizaron 358 ganglios, se instauró un punto de corte para RT-PCR comparando la expresión de CK19

en los ganglios con metástasis según el estudio histológico con los que no presentaban metástasis según éste último. Se obtuvo un resultado en el que el 100% de los ganglios con afectación según el estudio histológico y 9% de los ganglios sin afectación presentaron RT-PCR positiva para CK19⁵⁵.

Mikhiritan y colaboradores⁵⁶, en un estudio de cohortes multicéntrico, analizó mediante RT-PCR a tiempo real y estudio histológico los ganglios procedentes de ganglio centinela o linfadenectomía de 489 pacientes. Concluye que la sensibilidad de los dos métodos combinados es mayor que la del estudio histológico solo y reconoce la importancia de determinar un punto de corte adecuado para no elevar el número de falsos positivos.

La RT-PCR a tiempo real permite, por tanto, la determinación cuantitativa de la carga tumoral y además, posibilita el estudio intraoperatorio del ganglio.

Basándose en la técnica de RT-PCR a tiempo real, se han creado sistemas automatizados de análisis de ganglio centinela:

- Sistema OSNA^{57, 58} (One-Step nucleic Acid Amplification System): detecta citoqueratina 19 (CK19). Tiene la ventaja de ser una técnica automatizada, no patólogo-dependiente y fácilmente reproducible, con una concordancia de resultados del 96% respecto al análisis por hematoxilina-eosina, una sensibilidad del 82.7% y una especificidad del 96.9%. Es significativamente más sensible que la detección por inmunohistoquímica. Clasifica los resultados en negativos (<250 copias) micrometástasis

(≥ 250 a 5000 copias) o macrometástasis (≥ 5000 copias) equiparando resultados a la técnica estándar. Su fundamental ventaja es la velocidad de obtención del resultado y su simplicidad técnica. La mayor desventaja es que las metástasis en los casos de cáncer que no expresa citoqueratina 19 son indetectables por esta técnica. Está aprobado para la práctica clínica diaria.

- Sistema GeneSearch Breast Lymph Node^{59,60}: amplifica mRNA de mamoglobina y citoqueratina 19, aumentando la especificidad de la técnica. Se ha desarrollado después de un estudio en el que se probaron combinaciones de marcadores tumorales y controles génicos internos, que concluye que ésta es la combinación con mejor sensibilidad a una especificidad del 94%. Presenta calibrado para la no-detección de cargas tumorales pequeñas, no significativas en la práctica clínica. También está aprobado para la práctica clínica diaria.

Sin embargo, la repercusión clínica del estudio de ganglio centinela por RT-PCR, continúa siendo controvertida. No está demostrado si el aumento de sensibilidad de la técnica mejora la supervivencia de las pacientes y el significado de las micrometástasis es tema de controversia⁶¹.

El hallazgo de carga tumoral por técnicas moleculares y no por técnica de hematoxilina-eosina no es considerado actualmente como afectación ganglionar (N1) en la clasificación TNM, y no tiene repercusión en la actitud terapéutica. Sin embargo, en las últimas recomendaciones de la NCCN³⁹ se incluye la diferenciación de estos hallazgos, como se refleja en la Tabla 7.

Tabla 7. Clasificación TNM. Hallazgos inmunohistoquímicos y moleculares en el análisis patológico del ganglio centinela.

pN0	No metástasis ganglionares identificadas histológicamente
pN0(i-)	No metástasis ganglionares identificadas histológicamente, inmunohistoquímica negativa (IHC)
pN0(i+)	Células tumorales en ganglios regionales no mayores de 0.2mm (detectadas por hematoxilina-eosina o por inmunohistoquímica, incluidas células tumorales aisladas)
pN0(mol-)	No metástasis ganglionares identificadas histológicamente, estudio molecular negativo (RT-PCR)
pN0(mol+)	Estudio molecular positivo

V.B. TRATAMIENTO RADIOTERÁPICO

Consiste en la aplicación de radiaciones ionizantes que destruyen las células tumorales por bloqueo de su ciclo celular. Su objetivo es erradicar la posible enfermedad residual microscópica y minimizar la recurrencia local. Sus indicaciones son las siguientes:

1. Como complemento a la cirugía conservadora: radioterapia de la mama afectada. Reduce el riesgo de recidiva y aumenta la supervivencia global con respecto a la cirugía conservadora sin radioterapia.²⁷

2. Post-mastectomía: Radioterapia del lecho tumoral, pared torácica, axila y regiones supra e infraclavicular. Indicado en casos de alto riesgo de recidiva local. Disminuye el riesgo de recidiva loco-regional y aumenta la supervivencia total en pacientes con tumores mayores de 5cm y en aquellas con más de 4 ganglios axilares afectados.⁶²

V.C. TRATAMIENTO SISTÉMICO

Consiste en la terapia sistémica del cáncer de mama por medio de agentes quimioterápicos, terapia hormonal y/o agentes biológicos, principalmente trastuzumab, anticuerpo monoclonal específico contra HER2 (receptor para el factor de crecimiento endodérmico humano tipo 2). Se aplica antes o después del tratamiento local en el cáncer de mama operable según el tamaño tumoral y reduce de manera significativa el riesgo de recurrencia local y de muerte por cáncer.

La indicación y el tipo de terapia adyuvante dependen del riesgo de recaída y mortalidad de cada paciente, así como del beneficio/riesgo de cada terapia. En general, está indicada en todos los casos de cáncer de mama con afectación axilar y en tumores mayores de 1cm incluso con ausencia de afectación axilar. El riesgo de recaída se clasificó por categorías en el Consenso de Sant Gallen en 2005 como aparece en la Tabla 8. La elección del tipo de terapia adyuvante depende de factores clínico-patológicos, como el tamaño tumoral y la afectación axilar, y de factores moleculares como la presencia de receptores hormonales y la expresión de HER2³⁹.

Tabla 8. Categorías de Riesgo en pacientes operadas de cáncer de mama. Consenso de St. Gallen 2005

CATEGORIA DE RIESGO	CARACTERISTICAS DEL TUMOR
Bajo Riesgo	Ganglios negativos y todas las siguientes: pT \geq 2cm, grado I, ausencia de invasión vascular peritumoral, ausencia de sobreexpresión o amplificación del oncogen HER2/neu y edad \geq 35 años.
Riesgo Intermedio	Ganglios negativos y al menos una de las siguientes: PT > 2cm, grado 2-3, invasión vascular peritumoral, sobreexpresión o amplificación del oncogen HER2/neu, edad < 35 años.
	Ganglios positivos (1-3) y ausencia de sobreexpresión o amplificación del oncogen HER2/neu.
Alto Riesgo	Ganglios positivos (1-3) y Sobreexpresión o amplificación del oncogen HER2/neu.
	Ganglios positivos (>3)

V.C.1 Hormonoterapia

Su objetivo es evitar la estimulación de las células tumorales sensibles a hormonas por parte de los estrógenos endógenos. En principio será útil en aquellos casos en los que las células presenten receptores de estrógenos o/y progesterona, es decir, en los tumores hormonodependientes.

Los agentes terapéuticos existentes actúan, bien bloqueando el efecto de las hormonas en las células tumorales (moduladores selectivos del receptor estrogénico), bien

bloqueando la producción estrogénica (ooforectomía o análogos de GnRH en premenopáusicas, inhibidores de la aromatasa en postmenopáusicas)

- *Tamoxifeno*: modulador selectivo del receptor estrogénico, bloquea de manera selectiva el receptor estrogénico a nivel mamario. Útil en pacientes pre y postmenopáusicas, reducción de un 12% de riesgo de recurrencia y de 9% de riesgo de muerte por cáncer⁶³. Su uso es como tratamiento adyuvante durante 5 años en mujeres pre o postmenopáusicas.

- *Inhibidores de la Aromatasa*⁶⁴: Bloquean la aromatasa, enzima sintetizadora de estrógenos. Los ensayos clínicos sugieren que el tratamiento durante 5 años con inhibidores de la aromatasa en mujeres postmenopáusicas es tan o más efectivo que el tratamiento con tamoxifeno y presenta una mejor tolerancia.

V.C.2 Quimioterapia

Consiste en el tratamiento con drogas con efecto citostático o citotóxico, que bloquean o destruyen fundamentalmente células en la fase de división dentro del ciclo celular.

El tratamiento poliquimioterápico ha provocado un impacto en la supervivencia global de las pacientes con cáncer de mama. El beneficio de la quimioterapia es mayor en pacientes jóvenes y en pacientes con ganglios axilares positivos. Su uso es generalizado en pacientes con tumores con receptores hormonales negativos que precisan terapia

adyuvante (ganglios afectados, tumores mayores de 1cm, otros factores de mal pronóstico). En casos de tumores con receptores hormonales positivos, el beneficio de la quimioterapia es más controvertido y está aceptado mayoritariamente en pacientes con alto riesgo de recidiva⁶⁵.

V.C.3 Terapia biológica

El tratamiento con *Trastuzumab* (anticuerpo monoclonal humanizado anti-HER-2) ha demostrado ser efectivo en aquellos cánceres con sobreexpresión de la proteína HER2 (20% de los cánceres de mama). Está indicado además de tratamiento quimioterápico en los casos de afectación axilar y en los casos de alto riesgo, aun sin afectación axilar. Su principal efecto adverso es su cardiotoxicidad, principalmente si el tratamiento quimioterápico está basado en antraciclinas⁶⁶. El tratamiento junto con taxanos más carboplatino muestra beneficios comparables con menor cardiotoxicidad⁶⁷.

Más recientemente se están incorporando, dentro de ensayos clínicos, otras moléculas con características similares pero más específicas, como el *Lapatiniv* o el *TDMI*, que amplían las expectativas de este tipo de tratamientos.

VI. FACTORES PRONÓSTICO

Una vez establecido el diagnóstico de cáncer de mama invasivo, los factores pronósticos y predictivos suministran información sobre la evolución de la enfermedad. Su estudio intenta explicar la divergencia y heterogeneidad de la evolución clínica de las pacientes. Ayudan en la toma de decisiones sobre el manejo y tratamiento de la enfermedad delimitando el riesgo en cada caso.

VI.A. DEFINICIONES

Un factor predictivo es aquel que da información en cuanto a la respuesta a un tratamiento concreto. En ocasiones son la diana para ese tratamiento o sirven como moduladores de la expresión de expresión o función de dicha diana.

Por el contrario, un factor pronóstico se considera aquel que informa del pronóstico de la paciente en el momento del diagnóstico de cáncer de mama, independientemente de su terapia. Normalmente indican potencial invasivo o metastásico. Por ejemplo, el estado ganglionar es un factor pronóstico fundamental pero no tiene utilidad en la información de respuesta a la terapia.

Para que un dato sea considerado un factor pronóstico útil debe cumplir una serie de requisitos⁶⁸:

- Presentar un valor pronóstico significativo, independiente, validado y clínicamente probado.
- Su cuantificación debe ser reproducible y estar disponible.
- Su resultado debe ser fácilmente interpretable por el clínico.
- Su medición no debe consumir o inutilizar tejido necesario para el estudio anatomopatológico.

Ninguno de los factores pronósticos de los que se dispone en la actualidad cumple por completo estos criterios, sin embargo son considerados válidos los que mejor cumplen estas condiciones.

Aquellos universalmente aceptados y necesarios para la toma de decisiones son el estadio TNM, la afectación axilar, tamaño tumoral, grado histológico y el estado de los receptores hormonales.

VI.B. FACTORES PRONÓSTICO CLÁSICOS

Los factores pronóstico aceptados tradicionalmente son: el estado de los ganglios axilares, el tamaño tumoral, el grado y tipo histológico y la edad. Tabla 9.

Tabla 9. Factores Pronóstico clásicos

FACTORES PRONOSTICO CLÁSICOS DE CÁNCER DE MAMA
1- Estado de los ganglios axilares
2- Tamaño tumoral
3- Grado histológico
4- Tipo histológico
5- Edad

VI.B.1 Estado de los ganglios axilares

Es el factor pronóstico de mayor importancia; a mayor número de ganglios afectados, mayor tasa de recidivas y menor supervivencia. Por ello forma parte de la clasificación TNM (Tumor, Node, Metástasis), que divide a las pacientes en grupos pronóstico según presenten ganglios axilares negativos, 1-3 ganglios afectos, 4-9 ganglios afectos o más de 10.⁶⁹

VI.B.2 Tamaño tumoral

Es el diámetro máximo del componente infiltrante del tumor. Es un factor importante principalmente en estadios iniciales, con ganglios axilares negativos o menos de 3 ganglios afectados.⁷⁰

VI.B.3 Grado histológico

Es un término anatomopatológico que clasifica las células tumorales en cuanto a su diferencia con las células normales del mismo tejido. La clasificación Scarf-Bloom-Richardson es la más utilizada, se basa en el pleomorfismo nuclear, el índice mitótico y la formación de túbulos. A mayor grado histológico, peor pronóstico⁷⁰.

VI.B.4 Tipo histológico

Hace referencia al tipo de células originarias de la mama de las que derivan las células tumorales. El tipo histológico de referencia, por ser mucho más frecuente, es el carcinoma ductal infiltrante, derivado de los conductos glandulares, el siguiente en frecuencia es el carcinoma lobulillar, derivado de los conductillos de los lóbulos mamarios. Existen determinados subtipos histológicos de cáncer de mama (minoritarios) asociados con menor tasa de diseminación, normalmente asociados a bajo grado histológico y baja tasa de afectación ganglionar. Estos subtipos son los carcinomas tubulares, papilares puros y mucinosos.

VI.B.5 Edad

El diagnóstico de cáncer en mujeres jóvenes se asocia con alta incidencia de características agresivas del cáncer. Es un factor independiente de mal pronóstico, con menor índice de supervivencia global y libre de enfermedad.

VI.C. NUEVOS FACTORES PRONÓSTICO

Los factores pronóstico clásicos dan información sobre el pronóstico de cada paciente. Sin embargo, un porcentaje no desdeñable de pacientes presentan progresión de la enfermedad a pesar de presentar un aparente pronóstico favorable según estos factores. Por otro lado, la estandarización de la quimioterapia adyuvante ha reducido considerablemente la mortalidad por cáncer de mama, pero al mismo tiempo se sabe que muchas de estas pacientes reciben quimioterapia sin que ello les reporte ningún beneficio y sí una toxicidad substancial.

La consideración del cáncer de mama como enfermedad sistémica y su aparición como una acumulación de anomalías genéticas nos hace estudiar otros factores pronósticos, como marcadores bioquímicos o genes, para intentar determinar aquellos tumores que se comportarán de una manera más o menos agresiva y que por tanto necesitarán terapias adecuadas a este comportamiento.

La Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) publicó en 2007 una Guía Clínica de Factores Pronóstico del cáncer de mama evaluando cada uno de ellos y concluyendo una serie de recomendaciones para su utilización en la clínica diaria⁷¹.

La conclusión de estas guías clínicas es que debe realizarse siempre, ante el diagnóstico de cáncer de mama, la detección de receptores hormonales y de HER2 como valores pronósticos y predictivos fundamentales. Aceptan el uso de análisis multiparamétrico de la expresión génica y la detección de uPA (uroquinasa activadora de plasminógeno) y PAI-1 (inhibidor 1 del activador de plasminógeno) como predictores de riesgo de recidiva en casos determinados. Y, por último, acepta la utilidad de la detección de CTC (Células Tumorales Circulantes) en pacientes seleccionados de cáncer de mama con enfermedad metastásica y ausencia de enfermedad residual cuantificable. Considera insuficientes los datos obtenidos en los estudios sobre otros posibles factores pronóstico que se analizan. El valor pronóstico de cada marcador se detalla a continuación:

VI.C.1 Receptores hormonales

La detección de receptores hormonales se ha convertido en un dato esencial en el diagnóstico del cáncer de mama. Es un potente factor predictivo ya que informa de la respuesta a la terapia hormonal. Además, los estudios con quimioterapia adyuvante demuestran mayores beneficios de ésta en pacientes con cáncer de mama RE/RP (receptores estrogénicos/receptores de progesterona) negativos y respuestas mejores con diferentes líneas de quimioterápicos⁷². En cuanto a factor pronóstico, la evidencia

científica muestra mejor pronóstico en los pacientes con cáncer de mama con receptores hormonales positivos, al menos en los primeros 5-10 años⁷³.

VI.C.2 Sobre-expresión del Oncogen HER2

La detección de altos niveles del receptor de crecimiento endodérmico humano tipo 2 (HER2) por sobre-expresión de su oncogen HER2neu (detección mediante inmunohistoquímica o mediante FISH: Fluorescente In Situ Hybridation) está recomendado en el estudio de rutina ante el diagnóstico de un cáncer de mama⁷⁴.

Representa un importante factor predictivo, ya que su identificación indica aquellas pacientes a las que les producirá un beneficio el tratamiento con nuevas moléculas que tienen como diana el receptor HER2, como es el trastuzumab y otras nuevas moléculas de mecanismo semejante. Por otro lado, predice mejor respuesta al tratamiento quimioterápico basado en antraciclinas comparado con el tratamiento con ciclofosfamida, metotrexate, fluorouracilo (CMF).

Como factor pronóstico, la sobre-expresión del oncogen HER2 está asociado a peor pronóstico y se considera un valor útil a la hora de seleccionar aquellas pacientes de alto riesgo de recidiva a las que les será beneficioso el tratamiento quimioterápico adyuvante⁷⁵.

Sin embargo, la gran utilidad clínica de HER-2 como diana terapéutica y para la selección del tratamiento quimioterápico, hace que el pronóstico de las pacientes con

sobre-expresión del mismo posiblemente cambie en los próximos años y por tanto son necesarios nuevos estudios en cuanto a su nuevo valor como factor pronóstico²⁶.

VI.C.3 Marcadores de proliferación celular

La alta tasa de proliferación celular se relaciona con peor pronóstico en pacientes sin tratamiento. Se han realizado estudios con múltiples métodos para medir esta tasa de proliferación de manera que sea un factor pronóstico útil. Se puede citar entre ellos el índice mitótico, el índice de timidina, las fracciones en Fase S por citometría de flujo, antígenos de células proliferativas por inmunohistoquímica (Ki 67, PCNA: proliferating cell nuclear antigen) y el contenido de DNA.

El más utilizado es el Ki67 (*antígeno identificado con el anticuerpo monoclonal Ki67*), identifica células en proliferación porque sólo se expresa en el final de la fase G2 y M del ciclo celular. Un metaanálisis que incluye más de 12.000 pacientes demuestra que un valor positivo de Ki67 está relacionado significativamente con mayor riesgo de recidiva y menor supervivencia en el cáncer de mama⁷⁶.

La guía clínica de cáncer de mama de la sociedad española de oncología mamaria incluye el Ki67 entre las determinaciones rutinarias recomendadas en la clínica diaria⁷⁷. Sin embargo, la tasa de proliferación celular está incluida en el grado histológico al formar parte de éste el porcentaje de mitosis y no ha sido posible demostrar que estos marcadores de proliferación celular den información adicional al grado histológico⁷⁸. Por ello, a pesar de que en muchos centros se utiliza el Ki67 en la clínica diaria, la guía clínica de la ASCO

no lo incluye entre los factores pronósticos necesarios⁷¹ y las últimas revisiones mantienen que no hay estudios randomizados suficientes para asegurar su valor pronóstico aislado⁷⁸.

VI.C.4 Gen P53

Es un gen de supresión tumoral; numerosos estudios sugieren que la detección de mutaciones o delecciones del gen p53 por PCR o electroforesis, así como la detección de niveles elevados de proteína p53 (esta mutación provoca la acumulación de la proteína P53 que puede ser detectada por inmunohistoquímica) representa un factor pronóstico independiente de menor tiempo libre de enfermedad y supervivencia global⁷⁹. Por otro lado estos estudios muestran que la presencia de esta alteración está asociada a resistencia o sensibilidad a diferentes tratamientos quimioterápicos⁸⁰.

Sin embargo la variabilidad en la técnica de detección hace que no haya suficiente evidencia científica como para ser utilizado en la clínica diaria⁷¹.

VI.C.5 Marcadores de angiogénesis

La inducción de neovascularización por parte del tumor influye en su capacidad de crecimiento y metastización. Por ello, se han estudiado diferentes métodos de cuantificación de esta capacidad de angiogénesis y su relación con el pronóstico.

La primera técnica que se estudió fue la densidad vascular por medio de cuantificación de células endoteliales por IHC⁸¹. Existen estudios en los que se obtienen

resultados estadísticamente significativos como factor pronóstico independiente para el tiempo libre de enfermedad, sin embargo la variación en la técnica e interpretación de los datos hace que este marcador no sea considerado útil en la práctica diaria.

Otros factores angiogénicos, como el Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF-2, bFGF) o el Factor de crecimiento endotelial (VEGF), también han sido estudiados y relacionados con peor pronóstico en el cáncer de mama pero aun son necesarios estudios prospectivos randomizados para definir su valor pronóstico⁸².

VI.C.6 Catepsina D

Es una enzima proteolítica que participa de manera decisiva en la adherencia e invasión de la membrana basal y matriz extracelular lo que conlleva a la expansión tumoral, por lo que pudiera ser un indicador pronóstico.

Los niveles elevados de Catepsina D se asocian de manera significativa con riesgo elevado de recidiva.^{83,84} Como con muchos marcadores, la heterogeneidad metodológica en los estudios y el pequeño margen en sus resultados hace que no sean suficientes para considerarlo por el momento un factor pronóstico determinante para la toma de decisiones.

VI.C.7 Activadores del sistema uroquinasa-plasminógeno

El marcador uPA (activador del sistema uroquinasa-plasminógeno) es una serina proteasa que al unirse a su receptor (uPAR) induce el paso de plasminógeno a plasmina y media la degradación de la matriz extracelular promoviendo la invasión tumoral. Los marcadores PAI-1 y 2 son inhibidores específicos del activador del plasminógeno.

Los niveles elevados de uPA y PAI-1 en el tejido tumoral han demostrado tener un elevado valor pronóstico. Aparecen incluso en algunos estudios como el más fuerte predictor de tiempo libre de enfermedad y supervivencia global tras el estado ganglionar⁸⁵.

Aunque se siguen precisando mayores estudios, el valor de la detección de uPA y PAI-1 como factor pronóstico es muy prometedor y ya está aceptado por el panel de expertos de la ASCO para su uso en la clínica diaria: Un nivel bajo de estos marcadores, en pacientes con cáncer de mama con receptores hormonales positivos, indica suficiente disminución del riesgo como para considerar que el beneficio de un tratamiento quimioterápico adyuvante será mínimo⁸⁶.

VI.C.8 Marcadores tumorales

A pesar de aparecer en numerosos estudios como un posible factor pronóstico y obtener resultados estadísticamente significativos en algunos de ellos, especialmente el marcador CA 15.3, en la actualidad no son considerados útiles como factores pronóstico. Sólo son recomendados en el seguimiento de pacientes con enfermedad metastásica⁸⁷.

VI.C.9 Perfiles multigénicos

El análisis de la expresión génica parece tener un gran potencial para la estadificación pronóstica y la elección del tratamiento adyuvante en el cáncer de mama. Desde el consenso de St.Gallen de 2009 se recomienda el uso de plataformas multigénicas validadas para la mejor clasificación del cáncer de mama en los casos en los que la indicación de quimioterapia adyuvante sea dudosa⁸⁸.

Existen en la actualidad dos plataformas principales de estudio:

VI.C.9.1 *MammaPrint*⁸⁹

Clasifica como buen o mal pronóstico a pacientes afectadas de cáncer de mama estadio I o II según el perfil genético, detectado mediante el estudio por microarrays de 70 genes. Los estudios presentan datos significativos de que es un potente factor pronóstico. Está recientemente validado para poder ser utilizado en la clínica diaria, a la espera de los resultados definitivos de varios estudios randomizados como el MINDACT⁹⁰ en Europa.

VI.C.9.2 *Oncotype*⁹¹

Esta plataforma está aprobada por la FDA inicialmente en pacientes con cáncer de mama que presentan receptores hormonales positivos y ganglios axilares libres de enfermedad para clasificarlas en alto, medio o bajo riesgo de recurrencia. Evalúa la

expresión de 21 genes por reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa. Su propósito es identificar las pacientes que se beneficiarán de quimioterapia adyuvante.

Esta técnica puede aplicarse en muestras de tejido ya fijadas y por tanto, posibilita estudios retrospectivos y realización de la técnica en tumores muy pequeños. Está aceptada por la ASCO para ser utilizado en la clínica diaria como factor pronóstico⁸⁸. En la actualidad existen ensayos clínicos randomizados para su validación en pacientes con ganglio centinela positivo, con resultados provisionales significativos⁹².

VI.C.10 Células tumorales en médula ósea

Se ha considerado la identificación de células de cáncer de mama en la médula ósea como un indicador temprano de diseminación tumoral, mucho antes de la aparición de metástasis macroscópicas a distancia. Al estudiar su valor como marcador de recurrencia y supervivencia total, su presencia se relaciona con aumento de riesgo relativo de recidiva.⁹³ Sin embargo, esta identificación va acompañada generalmente de otros factores de mal pronóstico como el grado o el tamaño tumoral⁹⁴, y, por otra parte, sólo el 30-50 % de las pacientes con células tumorales en médula ósea presentarán metástasis macroscópicas en su evolución, por lo que no toda detección positiva de dichas células resulta relevante clínicamente. Estos resultados y la necesidad de hacer una prueba invasiva y dolorosa para su detección hace incierta su utilidad en el contexto clínico.⁷¹

VI.C.11 Células tumorales circulantes

La causa específica principal de muerte por cáncer es la metástasis a distancia. El comportamiento de esta enfermedad sugiere que, desde el momento en que el cáncer se hace infiltrante, tiene capacidad de diseminación celular al torrente circulatorio, de manera independiente a la afectación ganglionar por diseminación linfática. La presencia de células tumorales de cáncer de mama circulantes en el torrente sanguíneo parece jugar un importante papel en el desarrollo de metástasis a distancia.

Los avances tecnológicos han permitido la detección en sangre de células con características inmunogénicas y genéticas específicas de cáncer de mama de una manera exacta y reproducible: Células Tumorales Circulantes (CTC). Las 2 técnicas principales de detección son la inmunocitoquímica y la reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR).

La relación de la detección de CTC con el aumento de riesgo de recidiva y la disminución de la supervivencia, es decir, su utilidad como factor pronóstico, está siendo ampliamente estudiada. Los resultados son prometedores pero su utilidad en la clínica diaria continúa siendo controvertida.

Las Guía clínica de marcadores tumorales de la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) por el momento no incluye la detección de CTC dentro de los factores pronósticos con utilidad probada en la clínica diaria, ya que lo consideran pendiente de validación. No obstante, sí recomiendan su uso en el seguimiento por cáncer metastásico,

como indicador de progresión de la enfermedad ya que los datos existentes son suficientes para determinar que un aumento de los niveles de CTC en pacientes en seguimiento muestra progresión de la enfermedad de manera al menos tan eficaz como los estudios clínicos y de imagen estandarizados, fundamentalmente en pacientes con ausencia de enfermedad macroscópica residual⁶².

Cristofanilli y colaboradores, en un estudio multicéntrico prospectivo doble ciego,^{95,96} demostraron por primera vez en 2004 el valor pronóstico de la detección de CTC en pacientes con cáncer de mama metastásico con indicación de tratamiento sistémico. Esta detección, tomando como punto de corte el hallazgo de ≥ 5 CTC en 7,5mL de sangre periférica mediante la técnica de inmunofluorescencia (CellSearch assay) predecía, de una manera estadísticamente significativa, una supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global menor que en aquellas pacientes en las que no se había detectado CTC o su número era menor a 5/ 7,5mL. Es más, durante el tratamiento sistémico, la persistencia de altos niveles de estas células en las semanas tres a cinco tras el comienzo del tratamiento quimioterápico, se mostraba como un indicador de resistencia al tratamiento. Así mismo la elevación de los niveles de CTC en un momento dado se relacionaba con una progresión rápida de la enfermedad⁹⁷.

Estos resultados han sido corroborados por otros estudios posteriores en cáncer de mama metastático.^{98, 99}

Se ha estudiado también su utilidad en el seguimiento del cáncer de mama metastático, como seguimiento del tratamiento quimioterápico¹⁰⁰, como indicadores de

diseminación tumoral mucho antes de que puedan ser detectados focos metastáticos macroscópicos por las técnicas de imagen habituales y como indicadores de beneficio en el tratamiento sistémico al comparar niveles altos de CTC con los estudios de imagen, concluyendo que la detección de CTC podría ser un mejor y más temprano indicador¹⁰¹.

En el cáncer de mama avanzado no metastático, la detección de CTC previa al tratamiento neoadyuvante ha demostrado ser un potente factor pronóstico. Además, la evolución de la cuantificación de CTC antes y después del tratamiento neoadyuvante se ha relacionado con respuesta al tratamiento y con evolución de la enfermedad.^{102,103,104}

En la actualidad el peso de la evidencia apoya el papel de CTC como indicador pronóstico. Sin embargo, existen pocos estudios que relacionen CTC con cáncer de mama en estadios iniciales, necesarios para posibilitar su incorporación a la práctica clínica diaria⁴.

VII. INFLUENCIA DE LA CIRUGÍA EN LA DISEMINACIÓN TUMORAL

Se ha propuesto que la manipulación del tumor durante la cirugía podría facilitar la diseminación de células tumorales al torrente sanguíneo. La relación de estas células con la formación de metástasis ha sido motivo de debate. Estudios experimentales con animales defienden esta teoría¹⁰⁵.

Además existen mecanismos fisiopatológicos desencadenados durante la cirugía que apoyan esta propuesta: durante la cirugía se da una activación de la coagulación y una disminución en la actividad del sistema inmune por estrés; la presencia de fibrina y plaquetas en el torrente sanguíneo favorece el atrapamiento celular en la microcirculación; el sistema de detección de células alteradas será menos efectivo durante la cirugía y la alteración de la inmunidad permite un estímulo de la angiogénesis tumoral.^{106, 107}

La presencia de células tumorales en sangre periférica en el día del acto quirúrgico no necesariamente implica la posterior formación de metástasis. Sólo un 0.1% de las células sobreviven en la circulación sanguínea y únicamente el 0,01 forman metástasis. Se creía que la mayoría de éstas desaparecen de la sangre en las primeras 24 horas por destrucción en los lechos capilares. Sin embargo recientemente, mediante trabajos realizados con células tumorales con citoplasma marcado, se ha probado que parte de las células sobreviven en la sangre varios días después de su inyección¹⁰⁸.

Al estudiar el proceso de formación de metástasis, Chambers y colaboradores consideran que existen tres fases claves para la metastatización eficiente: permanencia de la célula tumoral en el torrente circulatorio, la capacidad de crecimiento de la célula tumoral en su depósito secundario y la angiogénesis que sea capaz de producir. Considera posibles mecanismos de latencia tumoral a las dos primeras¹⁰⁹.

La influencia de la manipulación quirúrgica en la diseminación de células tumorales se ha estudiado en diferentes aspectos. McCulloch¹¹⁰ et al. estudió la asociación entre la angiogénesis tumoral y la diseminación sanguínea de células durante la cirugía y encontró relación significativa entre ellas. En otro estudio el mismo autor¹⁰⁵ confirma que la cirugía de cáncer de mama en humanos provoca un aumento en la diseminación de células tumorales y propone estudios prospectivos para estudiar su implicación pronóstica y clínica.

Datta et al.¹¹¹ describieron la detección de CK-18 (citoqueratina 18) y DF-3 (mucina epitelial polimórfica) en sangre periférica de 12 pacientes antes, durante y después de la cirugía usando RT-PCR y demostraron un aumento del nivel de detección durante la cirugía. Sin embargo en otro estudio¹¹² con 49 pacientes con cáncer de mama usando RT-PCR con CK-19 y BHCG (gonadotropina coriónica humana- fracción beta) se halló que después de la cirugía, el número de células tumorales circulantes aumentó transitoriamente, pero en estos pacientes no se encontró correlación con el pronóstico.

Estudios más recientes, como el de Retsky en 2005¹¹³ proponen que la cirugía estimula la angiogénesis y que ésta podría acelerar la enfermedad principalmente en casos

de mujeres jóvenes con ganglios positivos ya que, al extirpar el tumor, por una parte se extirparía también la fuente de inhibidores de la angiogénesis y por otra parte podrían aparecer factores de crecimiento en respuesta al acto quirúrgico. Este autor resalta la importancia de la coordinación entre las terapias quirúrgicas y médicas.

La aparición de células epiteliales por motivo de la cirugía es un hallazgo común en estos trabajos, sin embargo no hay datos significativos sobre la relación de éstas con la metástasis y con el pronóstico de las pacientes.

Estos autores coinciden en concluir que son precisos más estudios al respecto ya que, si aquellas pacientes que presentan aumento de células tumorales a partir de la cirugía presentasen peor pronóstico por aparición de metástasis a distancia deberían reevaluarse las técnicas quirúrgicas y estudiar el posible aislamiento vascular durante la cirugía¹⁰⁵.

HIPOTESIS

Y

OBJETIVOS

HIPOTESIS

- La detección de CTC en sangre en carcinoma de mama precoz podría llegar a ser un marcador de riesgo de progresión de la enfermedad.
- Podría existir una relación entre el número de CTC y el estado del ganglio centinela en el momento del acto quirúrgico.
- La cirugía podría provocar un aumento de células tumorales circulantes en las primeras 24 horas postoperatorias.
- El aumento de células circulantes postquirúrgicas se podría correlacionar con peor pronóstico del cáncer de mama.
- El estudio biomolecular por la técnica de RT-PCR del ganglio centinela puede mejorar los resultados diagnósticos en la biopsia de ganglio centinela.

OBJETIVOS

- **Objetivo Genérico:**

- Determinación de Células Tumorales Circulantes (CTC) en sangre periférica en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama en estadio inicial con indicación de biopsia de ganglio centinela y estudio de su papel pronóstico.

- **Objetivos específicos:**

- Determinación de CTC previa y posterior a la cirugía.
- Determinación de la relación entre la detección de CTC y el resultado del ganglio centinela.
- Estudio molecular del ganglio centinela por medio de la técnica de RT-PCR de Citoqueratina19 y Mamoglobina y comparación con el estudio histológico del mismo.
- Análisis de la relación tanto de la detección de CTC como del estudio molecular del ganglio centinela con otros factores pronósticos.
- Evaluación del valor pronóstico tanto de la detección CTC como del estudio molecular del ganglio centinela. Estudio de supervivencia.
- Estudio de la influencia de la actividad quirúrgica en la diseminación de Células Tumorales Circulantes y su relación con la progresión del cáncer de mama.

PACIENTES Y MÉTODOS

I. PERIODO DE ESTUDIO

Este trabajo ha sido realizado durante el periodo comprendido entre los años 2007 y 2012 en el seno de un equipo multidisciplinario dedicado a la atención de pacientes con cáncer de mama, con la colaboración de los Servicios de Ginecología, Análisis Clínicos, Anatomía Patológica y Oncología del Hospital Universitario San Carlos de Madrid.

Las pacientes que entraron a formar parte del estudio fueron intervenidas entre Agosto del 2007 y Marzo del 2010. El periodo de seguimiento se realizó hasta Mayo de 2012.

II. PACIENTES

Se incluyeron en el estudio a 75 pacientes con carcinoma operable de mama sin afectación clínica axilar (T1N0-T2N0 clínico), las cuales fueron diagnosticadas por la sección de Patología Mamaria del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Clínico San Carlos y tratadas con cirugía primaria (conservadora o radical según indicación) más técnica del ganglio centinela, seguido de la correspondiente linfadenectomía en caso necesario. Todas ellas recibieron información sobre este estudio en las consultas de patología mamaria, junto a las aclaraciones de la intervención quirúrgica y aceptaron su participación, firmando el correspondiente consentimiento informado.

Durante los procesos de cirugía, toma de muestras o análisis de las mismas se invalidaron 15 pacientes para el estudio. Los motivos de invalidación fueron: fallo en la técnica de ganglio centinela, la no recogida de secciones para el estudio molecular tras la cirugía, la imposibilidad de extracción sanguínea previa o posterior a la intervención, la coagulación de la muestra de sangre desde la extracción hasta la recepción en el laboratorio de genómica. Por tanto, el tamaño muestral definitivo que se incluye en el trabajo es de 60 pacientes (N: 60).

II.A. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes con diagnóstico de carcinoma invasor operable de mama
- Mujeres
- Tumores menores de 5cm
- Axila clínicamente negativa (exploración y ecografía axilar no sospechosas)
- Indicación de Biopsia de ganglio centinela

II.B. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Estadio tumoral T4
- Metástasis a distancia
- Afectación clínica ganglionar
- Neoadyuvancia
- Contraindicación de biopsia de ganglio centinela

III. METODOLOGIA CLINICA

Se trata de un Estudio de Cohorte Prospectivo de series de casos clínicos.

III.A. PROCEDIMIENTO DE RECOGIDA DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA

Se realizaron dos extracciones sanguíneas a cada paciente, una previa a la cirugía el mismo día de ésta (extracción I) y otra durante las primeras 12 horas posteriores a la cirugía (extracción II). *Figura 4.*

Se extraen 10 ml de sangre en los tubos *Cellsave®* específicos para ello. Es preciso la asepsia previa y la venopunción cuidadosa. Se recomienda desechar el primer centímetro cúbico de sangre para evitar la contaminación de células epiteliales de la piel.

Asimismo, es necesario rellenar el tubo hasta que se detenga el flujo de sangre para asegurar la proporción correcta de la muestra con el anticoagulante y el conservante. La mezcla con estos productos debe hacerse cuidadosamente invirtiendo el tubo ocho veces para evitar la coagulación sin provocar lisis celular. Las muestras se conservarán en estos tubos que permiten preservar las células 72 horas a temperatura ambiente.

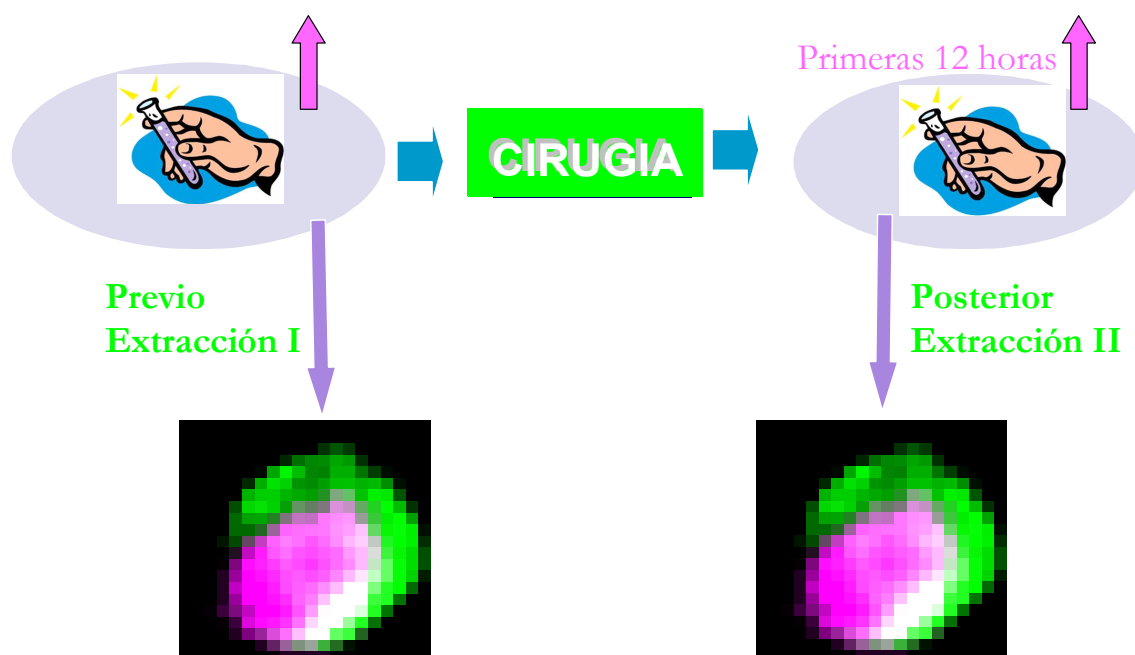


Figura 4. Procedimiento de recogida de muestras de sangre periférica.

III.B. LOCALIZACIÓN DE LOS GANGLIOS CENTINELA

Se realizó en todos los casos por medio de inyección y detección de isótopo radiactivo. Precisa la colaboración del servicio de medicina nuclear que, de 24 a 4 horas antes de la intervención, inyecta nanocoloides marcados con Tecnecio 99m (isótopo metaestable del tecnecio que se desintegra con emisión de rayos gamma) en forma de partículas inferiores a 80 nanómetros. Se administra en 4 inyecciones de 0,1ml, a una dosis preparada de 1 mCi (1 milicurio) por inyección, cada una en un cuadrante del área subareolar, de manera intradérmica.

Esta inyección de coloide puede realizarse también en el área tumoral o peritumoral. Sin embargo en este estudio y en nuestro centro por protocolo se realiza siempre subareolar ya que en una revisión de los resultados obtenidos en el mismo se

obtuvieron mejores resultados en la detección y menor porcentaje de migración hacia la mamaria interna.¹¹⁴

A continuación se realiza una linfogammagrafia para confirmar la migración del coloide, contar el número de ganglios marcados y definir la situación de los mismos en los diferentes niveles axilares o la posible migración extra-axilar, como se describe en la Tabla 10; en la actualidad su utilización se considera imprescindible.¹¹⁵

Para mejorar la localización de los ganglios en la anatomía de la paciente se realiza de manera complementaria un SPECT-TAC (tomografía computerizada por emisión de fotones simples combinada con tomografía axial computerizada) ya que sitúa mejor los depósitos de coloide en los tres niveles axilares y detecta mejor las trazas dérmicas de coloide que la gammagrafia.¹¹⁶ Estas técnicas de imagen se realizan normalmente entre 60 y 90 minutos tras la inyección y, en los casos en los que no se detecte migración, se repiten tras 20 horas, poco antes de la intervención quirúrgica. *Figura 5.*

Se realiza exéresis y análisis intraoperatorio de todos aquellos ganglios con actividad superior al 10% de la actividad del ganglio de referencia, que es aquel que presenta mayor actividad radiactiva medida con la sonda gammagráfica. Es aceptable la obtención de 4 ganglios centinela como máximo³⁴.

Tabla 10. Linfogamagrafía. Utilidades.

VENTAJAS DE LA LINFOGAMMAGRAFIA ¹¹⁵
<ul style="list-style-type: none"> - Define las regiones de drenaje. Identifica los drenajes extra-axilares <ul style="list-style-type: none"> - Modificación del procedimiento quirúrgico (cirugía de la mamaria interna) - Correcta estadificación y tratamiento adyuvante posterior - Identifica el número de ganglios <ul style="list-style-type: none"> - Distingue ganglios centinela de ganglios secundarios - Localiza mayor número de GC (proyecciones oblicuas, d. prono, bipedestación) - Alerta en casos de no visualización del GC <ul style="list-style-type: none"> - Imágenes tardías - Reinyección del radiotrazador - Planificación de la intervención con vistas a probable linfadenectomía - Permite marcar sobre la piel la proyección del GC: dirige incisión quirúrgica axilar <ul style="list-style-type: none"> - Acorta tiempo quirúrgico - Incisión mínima, mejor estética, menor morbilidad - Especialmente útil para cirujanos en formación - Evita errores en la identificación del GC debidos a: <ul style="list-style-type: none"> - Fenómeno “shine-through” (GC oculto por la proximidad de la actividad inyectada en tumor, habitual en axila con tumor en CSE y menos frecuente en cadena mamaria interna con tumor en cuadrantes internos) - Contaminación de la superficie cutánea

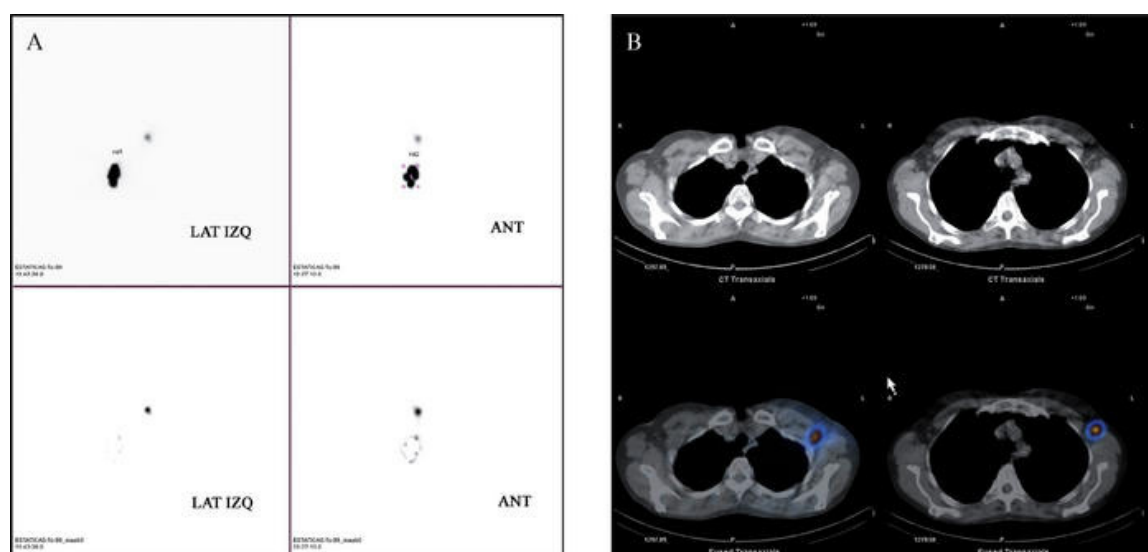


Figura 5. SPECT-TAC en la localización de ganglio centinela.

Se observa un solo depósito de radiotrazador en las imágenes planares (A) que presenta un posible trayecto hacia él. La tomografía computerizada por emisión de fotones simples-tomografía axial computerizada (SPECT-TAC) demuestra dos ganglios centinela (B), uno más craneal (a la izquierda) y otro más caudal (a la derecha) ambos en el nivel I de Berg, como después se confirmó en el quirófano.

III.C. CIRUGÍA

- Se completó el tratamiento quirúrgico adecuado con cirugía primaria, conservadora o radical según indicación, y técnica del ganglio centinela. En todos los casos de tumorectomía se comprobaron los márgenes de la pieza de manera intraoperatoria y se realizaron ampliaciones en caso necesario para asegurar márgenes libres. En todos los casos de cirugía radical se realizó una mastectomía simple modificada ahorradora de piel en la que se reseca el complejo areola pezón y la fascia del pectoral mayor, conservando éste. En pacientes jóvenes se realizó reconstrucción inmediata de la mama.

- La detección del ganglio centinela se realizó en quirófano mediante una sonda gammadetectora portátil. Previa comprobación de grado de actividad periareolar y en axila desde piel como referencia, se llevó a cabo una incisión en axila por debajo del límite del pectoral mayor o en el límite del vello axilar y una apertura de la fascia superficial para acceder al territorio ganglionar de la axila. De esta manera se puede explorar la axila clínicamente para detectar algún ganglio sospechoso por tamaño o consistencia y a continuación realizar la exploración con la sonda-gamma.

- El ganglio linfático de mayor actividad y todos aquellos que presentaron actividad superior al 10% de éste fueron resecados. Se comprobó la concordancia de los ganglios resecados con los detectados en las técnicas de imagen, así como la ausencia de actividad residual en axila mayor del 10% del ganglio de referencia. Por otro lado, se realizó un conteo in vivo y ex vivo en cada ganglio para comprobar que la actividad detectada correspondía al ganglio resecado. El número máximo de ganglios centinela resecados fue 4 ya que el beneficio de no hacer linfadenectomía desaparece a partir de esa cifra.

III.D. ANÁLISIS INTRAOPERATORIO DE LOS GANGLIOS CENTINELA

Los ganglios centinela obtenidos se dividieron en secciones de manera que el mismo ganglio pudiera ser estudiado por 2 técnicas. Se enviaron la mitad de las secciones al Servicio de Anatomía Patológica para el estudio convencional y la otra mitad al Departamento de Genómica del Servicio de Análisis Clínicos para el estudio molecular por RT-PCR. Las secciones remitidas al Servicio de Anatomía Patológica se analizaron de forma intraoperatoria con las técnicas clásicas de citología y de congelación. En caso de detectar metástasis se realizó linfadenectomía axilar en la misma intervención.

III.E. RECOGIDA DE DATOS

Se recogieron de forma prospectiva los datos clínicos, quirúrgicos y anatomopatológicos, así como el posterior tratamiento adyuvante y evolución de cada paciente para su estudio y análisis estadístico.

IV. METODOLOGIA ANALITICA

IV.A. ANÁLISIS DE SANGRE PERIFÉRICA: DETECCIÓN DE CTC

La metástasis en el cáncer se produce cuando las células desplazadas de un tumor primario o metastático por el torrente circulatorio acceden a lugares distantes del organismo y crecen en ellos. Los carcinomas son neoplasias que proceden de células epiteliales y, por tanto, serán células de tipo epitelial las que pueden liberarse a la sangre procedentes de un carcinoma de mama. La técnica que utilizamos se basa en que en condiciones normales en el torrente circulatorio no existen células epiteliales y su presencia, en el contexto de un cáncer de mama, es referencia de diseminación del mismo.

La detección de estas células se realiza mediante un sistema de procesamiento complejo: El *CellTrack® AytoPrep System* permite estandarizar y automatizar el protocolo de preparación de las muestras para su uso con *CellSearch Circulating Tumor Cell Kit*. El análisis y enumeración de las CTC se realiza utilizando el *CellTracks Analyzer II*, un microscopio de fluorescencia semiautomático.

IV.A.1 Principios del procedimiento

El *CellSearch Kit* contiene un reactivo de captura basado en un ferrofluido y reactivos inmunofluorescentes. El reactivo de ferrofluido consiste en nanopartículas con un núcleo magnético rodeado de una capa polimérica revestida con anticuerpos dirigidos al antígeno EpCAM (molécula de adhesión de la célula epitelial) para la captura de las

CTC. Tras la captura inmunomagnética y el enriquecimiento, se añaden reactivos fluorescentes para la identificación y enumeración de las CTC. Los reactivos fluorescentes incluyen: anti-CK-Phycoerthin (PE) específico para la proteína citoqueratina intracelular (característica de células epiteliales), DAPI (tinción para ácidos nucleicos) que tiñe el núcleo celular y anti-CD45-Allophycocyanin (APC) específico para leucocitos.

El conjunto del reactivo con la muestra se administra mediante el *CellTracks AutoPrep System* en un cartucho que se introduce en un dispositivo de presentación celular. El fuerte campo magnético de este dispositivo atrae a las células epiteliales marcadas magnéticamente hacia la superficie del cartucho. *CellTracks Analyzer II* explora automáticamente toda la superficie del cartucho, adquiere las imágenes y muestra cualquier evento donde CK-PE y DAPI aparecen en el mismo lugar. Las imágenes son presentadas en formato de galería para su clasificación final. Un evento es clasificado como célula tumoral cuando sus características morfológicas son coherentes con las de una célula tumoral y muestra el fenotipo EpCAM+, CK+, DAPI+ y CD45-. Figura 6.

Por tanto, las muestras de sangre periférica se procesan en un sistema semiautomático que permite identificar por fluorescencia las células epiteliales marcadas. Los leucocitos, al ser células nucleadas de la sangre y teñirse con DAPI, podrían dar lugar a confusión, por lo que se identifican mediante el anti-CD45 marcado con fluoresceína para descartarlas. Los resultados obtenidos por analizador celular aparecen como imágenes escaneadas, que deben ser interpretadas por dos investigadores expertos, formados específicamente en la identificación celular. La interpretación de las imágenes es un proceso laborioso y que precisa mucho tiempo de dedicación

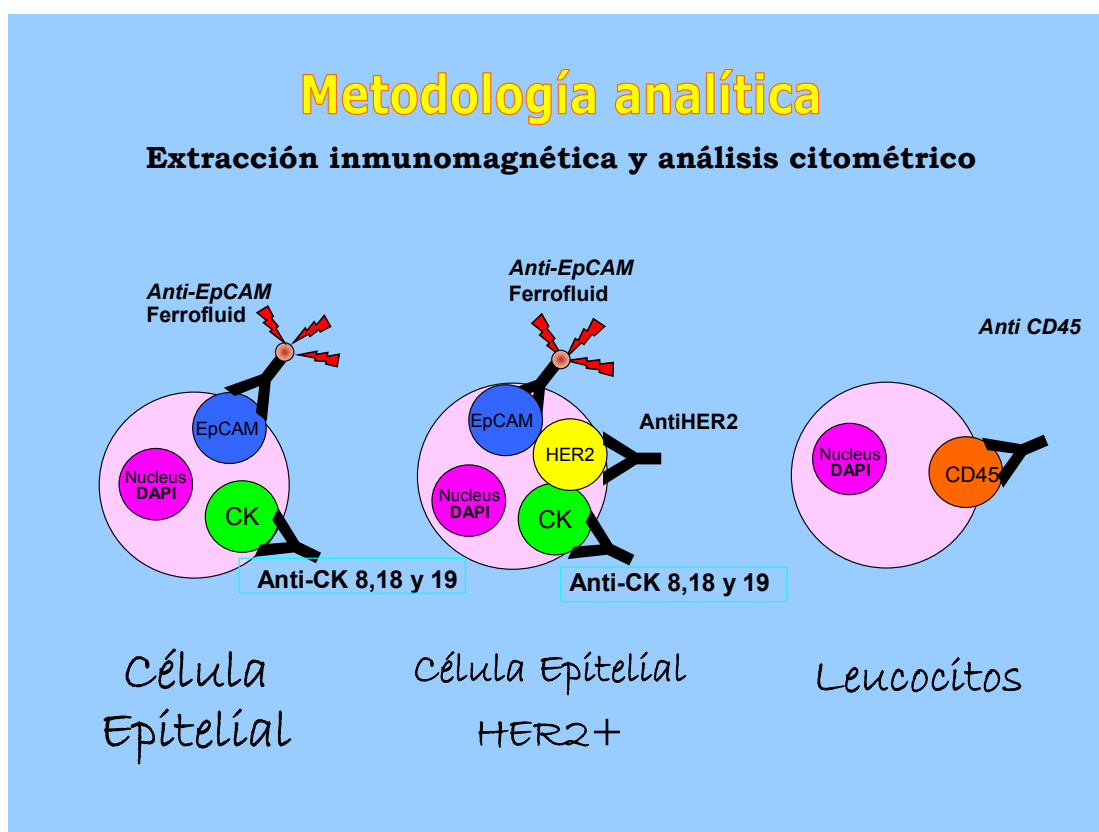


Figura 6. Metodología analítica. Extracción inmunomagnética y análisis citométrico.

IV.A.2 Secuencia del procedimiento

- Obtención y preservación de sangre total.
- Separación inmunomagnética de las células.
- Tinción inmunohistoquímica/fluorescente de las células.
- Cuantificación celular y almacenamiento de imágenes.

Este método combina técnicas biológicas y automáticas de aislamiento, detección celular y visualización con microscopía inmunofluorescente de las células tumorales circulantes. No utiliza técnicas de identificación morfológica ni molecular.

IV.B. ANÁLISIS DE GANGLIO CENTINELA

El análisis del ganglio centinela se realiza mediante 2 procesos: estudio histológico según el protocolo del Hospital Clínico San Carlos y estudio molecular mediante RT-PCR, como proceso específico en esta tesis. Por ello debe destinarse parte del material ganglionar a cada tipo de estudio. Para obtener uniformidad en las muestras, cada uno de los ganglios se seccionan obteniendo muestras de 1,5 a 3mm que se distribuyen en los 2 tipos de estudio que se hará.

IV.B.1 Estudio histológico

Según el protocolo¹¹⁷ de estudio del ganglio centinela del Departamento de Anatomía Patológica, los cortes seleccionados para estudio histológico se analizan de manera intraoperatoria y diferida, en las etapas que se describen a continuación:

- Deben estudiarse todos los ganglios centinela remitidos por el cirujano.
- Tallado de GC: debe disecarse cuidadosamente del tejido adiposo que le rodea, medirse y tallarse siguiendo el eje mayor en secciones de hasta 2mm. Si el grosor del GC es inferior a 5 mm normalmente se incluye completo, sin cortes, aunque en nuestro trabajo sí se realizó una sección para el estudio molecular. Cada ganglio identificado debe incluirse en una cápsula separada. Deben estudiarse todas las secciones obtenidas.

- Estudio intraoperatorio: se realiza en un corte congelado y teñido con Hematoxilina-Eosina de cada ganglio resecado. Como complemento se puede realizar una impronta o frotis citológico.

- Estudio diferido: Estudio seriado de todo el ganglio centinela tras la fijación en formol e inclusión en parafina de todas las secciones de cada GC realizadas a intervalos de 0,2mm. De cada sección, una cara se tiñe con hematoxilina-eosina y la otra se reserva por si es necesaria la realización de técnicas de inmunohistoquímica.

- Inmunohistoquímica: no se realiza de rutina, sólo en casos dudosos ya que, aunque incrementa la detección de células tumorales aisladas y pequeños grupos de células tumorales, aumenta también el tiempo y el coste del procedimiento desproporcionadamente. Útil en el caso del carcinoma lobulillar ya que las células tumorales se pueden parecer mucho a los linfocitos del ganglio.

- Realización de un informe que incluya definición de hallazgos por TNM (Tumor-Node-Metástasis).

IV.B.2 Análisis Biomolecular del ganglio centinela

Los cortes seleccionados para estudio molecular son procesados y estudiados por el laboratorio de Biología Molecular.

La técnica consiste en la búsqueda de dos marcadores de tejido mamario en el tejido ganglionar: Mamoglobina (MG) y Citoqueratina 19 (CK19). Su detección en el ganglio, por tanto, indica micrometástasis. Esta detección se realiza mediante la ampliación de genoma por reacción en cadena de la polimerasa en combinación con transcripción inversa que obtiene DNA a partir de RNA celular (RT-PCR).

IV.B.2.1 *Procesamiento de las muestras*

Una vez extraído el ganglio centinela en quirófano, las secciones del mismo que serán destinadas al estudio molecular deben preservarse en una solución estabilizadora de RNA (RNA Later[®]) ya que el estudio se realiza a partir de RNA y por tanto es preciso evitar la acción de enzimas RNAsas. En esta solución se puede conservar en nevera o temperatura ambiente 24 horas.

Debe separarse correctamente el ganglio del tejido graso circundante y evitar la contaminación con tejido mamario primario (evitar utilizar el mismo material quirúrgico que durante la tumorectomía) lo que podría conllevar un falso positivo. La utilización de

esta técnica debe evitarse en pacientes diagnosticados de otros tipos de cáncer simultáneos, como por ejemplo linfoma por el riesgo de falsos positivos.

A continuación se procede a la extracción de RNA del tejido ganglionar mediante el *Kit RNeasy*. Esta técnica consiste en homogenizar la muestra con β - mercaptoetanol y un tampón específico de lisis y, mediante lavados y centrifugado, aislar RNA. Ésta muestra se somete a congelación -80°C. El objetivo es obtener entre 0,3 y 3 μ g de RNA por cada miligramo de de tejido ganglionar.

IV.B.2.2 *Aplicación de RT-PCR*

Implica el paso de RNA a DNA mediante transcripción inversa y la ampliación de éste para detectar la expresión génica de CK19 y MG de manera independiente. Para ello se utilizan unos “primers” (Figura 7, Figura 8) o cebadores de DNA específicos de cada uno de estos marcadores que permiten la ampliación únicamente de los genes implicados.

Primer Sentido: 5' – AGA TGA GCA GGT CCG AGG TTA-3'

Primer AntiSentido: 5' – CCT GAT TCT GCC GCT CAC TAT CA-3'

Figura 7. Primers empleados en la RT-PCR convencional de la citoqueratina 19.

Primer Sentido: 5' – CAA ACG GAT GAA ACT CTG AGC AAT GTT GA-3'

Primer AntiSense: 5' – TCT GTG AGC CAA AGG TCT TGC AGA-3'

Figura 8. Primers empleados en la RT-PCR convencional de la mamoglobina.

Este proceso se realiza mediante el *kit One Step RT-PCR* (Quiagen) que contiene la mezcla adecuada de los componentes necesarios para esta reacción: enzima retrotranscriptasa, enzima Taq polimerasa, dinucleótidos trifosfato (dNTPs), los *primers* y un tampón específico con cloruro magnésico. Tabla 11. La muestra precisa un proceso específico de ciclos a diferente temperatura en el termociclador para completar la amplificación. Tabla 12.

Tabla 11. Mezcla de la reacción para el estudio de la citoqueratina 19 y mamoglobina, mediante el OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN).

	CITOQUERATINA 19 y MAMOGLOBINA	
Componente	Volumen	Concentración Final
Agua sin RNasas	1 µl	--
5x Buffer	5 µl	1x
dNTP Mix	1 µl	400 mM de cada dNTP
Primer S	1 µl	0,6 µM
Primer AS	1 µl	0,6 µM
Enzyme mix	1 µl	--
RNA	5 µl	--

Tabla 12. Ciclos del programa del termociclador para la amplificación del RNA de la citoqueratina 19 y mamoglobina.

	CITOQUERATI NA 19	MAMOGLOBIN A
1 ciclo	50°C durante 30 minutos	50°C durante 30 minutos
1 ciclo	95°C durante 15 minutos	95°C durante 15 minutos
30 ciclos	94°C durante 30 segundos 60°C durante 30	94°C durante 30 segundos 65°C durante 30

	segundos 72°C durante 1 minuto	segundos 72°C durante 1 minuto
1 ciclo	72°C durante 10 minutos	72°C durante 10 minutos
1 ciclo	4°C indefinido*	4°C indefinido*

IV.B.2.3 *Electroforesis*

A continuación se procede a realizar la electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12%, 130V, 70 minutos. Mediante luz ultravioleta se podrá visualizar la migración del DNA amplificado según su peso molecular. Se utiliza como referencia una serie de marcadores con diferentes pesos moleculares. Se considera que hay un resultado positivo para CK19 o MG en aquellas muestras en las que aparezca una banda acorde al peso molecular del DNA de las mismas. Figura 9, Figura 10.

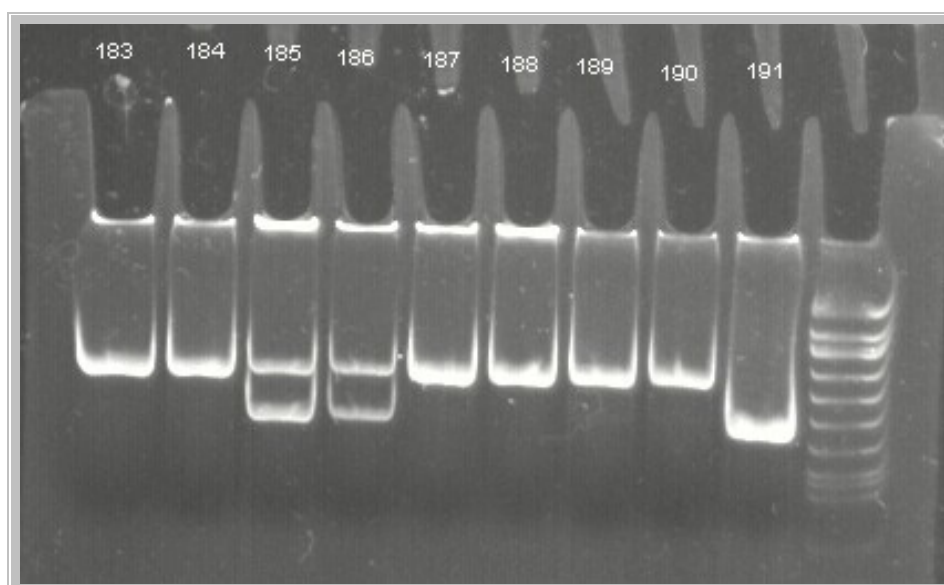


Figura 9. Electroforesis. Citoqueratina 19.

Migración tras electroforesis observada mediante luz ultravioleta del DNA amplificado para la citoqueratina 19 de cada paciente, y para los marcadores de peso molecular. Resultado positivo en los casos número: 185, 186 y 191.

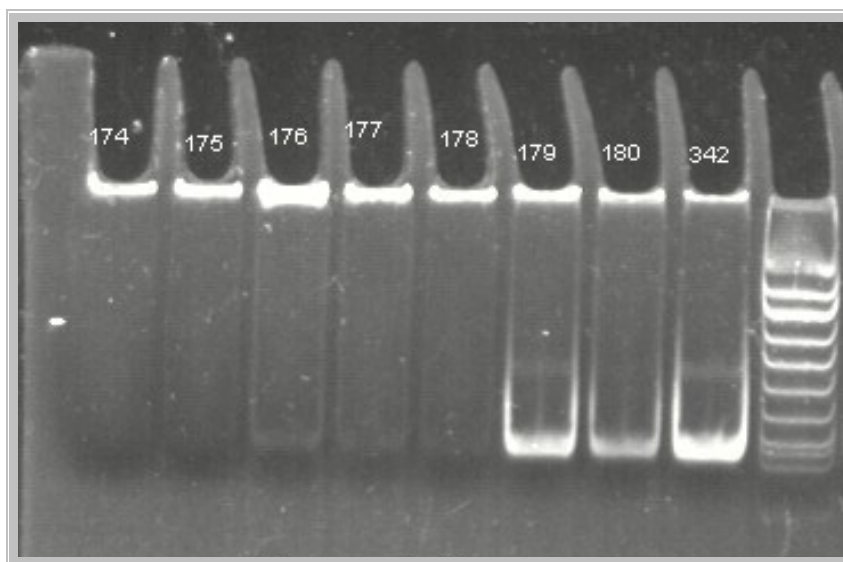


Figura 10. Electroforesis. Mamoglobina.

Migración tras electroforesis observada mediante luz ultravioleta del DNA amplificado para la mamoglobina de cada paciente, y para los marcadores de peso molecular. Resultados positivos para mamoglobina en los casos número: 179, 180 y 342.

IV.B.2.4 Resultados moleculares de las muestras de ganglio centinela

- Positivo para MG y CK 19: micrometástasis de cáncer de mama
- No concordantes: micrometástasis de cáncer de mama.
- Negativo para MG y CK19: negativo para malignidad pero es preciso comprobar la integridad del RNA estudiado.

IV.B.2.5 Valoración de la integridad del RNA:

Se debe aplicar el RNA total en un gel de agarosa 1% en condiciones desnaturalizantes, se tiñe con bromuro de etidio y se comprueba, bajo luz ultravioleta, que existen bandas de las subunidades 28S y 18S del RNA ribosómico. De esta manera confirmamos la integridad del RNA; si no se puede confirmar, podría tratarse de un falso negativo y la técnica no sería válida.

V. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

V.A. ESTUDIO DESCRIPTIVO

Se realizó un estudio descriptivo de la edad de la paciente, antecedentes personales y familiares de cáncer, características del tumor, técnicas de detección y de imagen, diagnóstico anatómo-patológico, tipo de cirugía, número de cirugías, características del ganglio centinela (GC), CTC, linfadenectomía, receptores hormonales, oncogen HER2-Neu, Ki67, tratamiento radioterápico y sistémico, y de las variables de supervivencia (SLE y SG).

Las variables cuantitativas se han resumido en su media, desviación estándar (DE) e intervalo de confianza al 95% (IC95%) o mediana y rango intercuartílico (RIQ: P25-P75) en caso de presentar demasiada dispersión y asimetría. Las variables cualitativas se han presentado con su distribución de frecuencias absoluta y relativa.

V.B. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE VARIABLES

Para la comparación entre las variables cualitativas del estudio se utilizó la prueba exacta de Fisher al hallarse frecuencias esperadas inferiores a 5 en más del 25%. Para comparar las variables cuantitativas, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, que compara las medianas de los grupos determinados por las categorías de las variables cualitativas, y la prueba de la mediana, al no ajustarse a una distribución normal.

Para determinar la fuerza de correlación entre las variables edad, CTC1 y CTC2, número de ganglios centinela totales y positivos se utilizó el coeficiente de Spearman, test no paramétrico para variables cuantitativas.

V.C. DETECCIÓN DE CAMBIOS EN LOS NIVELES DE CTC INDUCIDOS POR LA CIRUGÍA

Para averiguar si la cirugía había modificado los niveles de CTC1 (pre-cirugía) y CTC2 (post-cirugía) se compararon las mediciones de dichas variables mediante dos pruebas no paramétricas para medidas repetidas ya que se comprobó que no seguían una distribución normal. Estas pruebas fueron: el *test exacto bilateral de Wilcoxon* y el *test exacto bilateral de homogeneidad marginal*.

V.D. ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA GLOBAL Y LIBRE DE ENFERMEDAD

V.D.1 Definición de la supervivencia

— Supervivencia global (SG): Se define como el periodo comprendido entre el inicio del tratamiento o cirugía hasta el fallecimiento por cáncer de mama, el fallecimiento por otras causas o, si no aparece el evento, hasta la finalización del seguimiento.

— Supervivencia libre de enfermedad (SLE): Se define como el periodo comprendido desde la desaparición o remisión de la enfermedad hasta la aparición de

nuevo de la misma (recidiva), o del fallecimiento por otras causas o bien, si no aparece el evento a estudio, hasta la finalización del seguimiento.

V.D.2 Tablas de supervivencia acumulada y comparación de las curvas de supervivencia

Para estimar la probabilidad de supervivencia individual acumulada a lo largo del tiempo se empleó el método no paramétrico de Kaplan-Meier y se comprobó que la censura no fuese informativa. Asimismo se representó en gráficas del estimador de Kaplan-Meier y se describieron en tablas de supervivencia el porcentaje de supervivencia, tanto para SG como SLE, su intervalo de confianza del 95% (IC 95%) y el número de pacientes a riesgo para el siguiente periodo (n) para cuatro momentos definidos: a 6, 12, 36 y 48 meses. La elección de estos momentos puntuales en los que se calculó la supervivencia fue arbitraria pero se intentó ajustarlas a la aparición de los eventos, que fueron para SG: 4 meses, 18 meses y 45 meses y para SLE: 3 meses, 4 meses y 40 meses.

La comparación de curvas de supervivencia se realizó mediante los test Log-Rank y Breslow (también llamado Test Generalizado de Wilcoxon) evaluándose que los grupos comparados presentasen igual o diferente supervivencia.

El test de Log-Rank tiene en cuenta las diferencias de supervivencia entre grupos en todos los puntos del tiempo en que dura el seguimiento, en cambio, el test de Breslow pondera más las diferencias de supervivencia entre grupos al comienzo del estudio que hacia el final del mismo. El nivel de significación en la comparación se fijó en $\alpha=0,05$.

V.D.3 Análisis univariable de la supervivencia mediante el modelo de riesgos proporcionales o regresión de Cox

Con el fin de valorar el efecto de las variables independientes a estudio sobre la supervivencia (SG y SLE) se usó el modelo de riesgos proporcionales (*proportional hazards model*) o regresión de Cox. En el análisis univariable se determinó, por cada una de las variables: la medida de efecto de la supervivencia de un grupo frente al grupo de referencia (*hazard ratio* (HR) o *riesgo relativo* (RR)), su intervalo de confianza del 95% (IC95%) y el nivel de significación obtenido, comprobándose que la razón de tasas instantáneas (HR) era constante a lo largo del tiempo.

V.D.4 Análisis multivariable de la supervivencia: Ecuación Final del Modelo de Regresión de Cox

Una vez realizado el análisis univariable se procedió al análisis multivariable ajustando el modelo final por las variables que se hallaron significativas: CTC, Recidiva Loco-Regional y Metástasis a distancia para SG y CTC y Metástasis a distancia para SLE. Se introdujeron dichas variables obteniéndose modelos inestables ya que como regla, al menos se necesitan 10 eventos (muertes/recidivas) por cada variable que se introduzca en el modelo; en este caso sólo se registraron 3 eventos para cada tipo de supervivencia evaluada, por lo que se decidió sólo incluir una variable independiente en el análisis. Para ambos modelos (SG y SLE) se definió la ecuación final del modelo y se calcularon los coeficientes B de la variable predictiva, error estándar (EE), la medida de efecto (HR o RR) y los intervalos de confianza (IC95%).

V.E. ESTUDIO DE ESPECIFICIDAD

El estudio de especificidad consistió en construir una curva COR (ROC curve) mediante la cual se calcularon los puntos de corte para las variables MG, CK19 y PCR con más alta sensibilidad y especificidad respecto a la variable gold standard o variable de referencia: diagnóstico histológico del Ganglio Centinela. También se representó el área bajo la curva (AUC), su IC95% y el nivel de significación.

Posteriormente se estimó la sensibilidad, especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo para las diferentes pruebas diagnósticas, según el punto de corte determinado para cada variable.

V.F. NIVEL DE SIGNIFICACIÓN Y PROGRAMAS ESTADÍSTICOS EMPLEADOS

Todas las comparaciones estadísticas se realizaron utilizando la prueba bilateral a un nivel de significación $\alpha=0,05$. El programa estadístico que se empleó fue PASW Statistics versión 19.0 (IBM-SPSS Inc., EE.UU.) y EPIDAT 3.1. (Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia, España), siendo analizados los datos por la Unidad de Soporte a la Investigación Clínica del Hospital Universitario Infanta Leonor.

RESULTADOS

I. ESTUDIO DESCRIPTIVO

I.A. ESTUDIO DE LA POBLACIÓN

I.A.1 Tamaño muestral

Se incluyeron en el estudio a 75 pacientes diagnosticadas de carcinoma de mama en estadios iniciales y sin afectación axilar tras exploración clínica y ecográfica de la axila (T1N0-T2N0 clínico) en el servicio de ginecología del Hospital Clínico San Carlos. Durante el proceso de recogida de las muestras se invalidaron 15 pacientes (como se ha descrito en el apartado de Pacientes y Métodos) por lo que el tamaño muestral definitivo fue de 60 pacientes.

I.A.2 Edad

La edad media de las pacientes en el momento del diagnóstico es de 58 años con un intervalo de confianza para la media al 95% (IC95%) de 55 a 61 años. La paciente más joven incluida en el estudio presenta 37 años en el momento del diagnóstico y la más mayor, 85 años.

I.A.3 Antecedentes familiares

El 38% de las pacientes presentaban antecedentes familiares de primer grado de cáncer mamario o colon.

I.A.4 Antecedentes personales

Entre los antecedentes personales de las pacientes, ha sido objeto de estudio el diagnóstico previo de cáncer de mama o de otros cánceres ginecológicos. En la muestra, 2 de las 60 pacientes (3,3%) presentaron con anterioridad cáncer de mama en la mama contralateral y 3 pacientes (5%) habían presentado otros cánceres ginecológicos.

Respecto a la paridad, el 33% de las pacientes no habían tenido ninguna gestación a término, el 15% únicamente una gestación a término y el 52% habían tenido dos o más gestaciones a término. La mediana de la muestra fueron 2 gestaciones a término.

Asimismo se han estudiado los antecedentes de la muestra en cuanto a la toma de anticonceptivos orales o terapia hormonal sustitutiva. Se dividió a las pacientes en 3 grupos según hubieran seguido tratamientos hormonales durante más de 5 años, menos de 5 años o nunca. Tan solo el 17% de las pacientes han seguido un tratamiento de este tipo, el 5% corresponde a mujeres con tratamiento hormonal durante menos de 5 años y el 11,7% a aquellas que siguieron el tratamiento durante 5 años o más. Tabla 13.

Tabla 13. Estudio Descriptivo. Características de la población.

		N	%	N válido
Antecedentes Familiares de cáncer de mama/colon	Sí	23	38,3%	60
	No	37	61,7%	
	Total			
Antecedentes Personales de cáncer de mama	Sí	2	3,3%	60
	No	58	96,7%	
	Total			
Antecedentes Personales de otros cánceres ginecológicos/ colon	Sí	3	5,0%	60
	No	57	95,0%	
	Total			
Número Gestaciones	0	20	33,3%	60
	1	9	15,0%	
	2	18	30,0%	
	3	10	16,7%	
	4	3	5,0%	
	Total			
Anticonceptivos orales o Tratamiento hormonal	Sí	10	16,7%	60
	No	50	83,3%	
	Total			
Tiempo de tratamiento hormonal	No	50	83,3%	60
	<5 años	3	5,0%	
	≥5 años	7	11,7%	
	Total			

I.A.5 Características del tumor

Se recogieron los datos sobre el porcentaje de casos con lesiones clínicamente detectables en el momento del diagnóstico, la localización de las mismas y el motivo de consulta o de inicio de estudios. Tabla 14.

En 35 pacientes (58%) la lesión era palpable, independientemente de si el diagnóstico de sospecha se había realizado por la clínica o si se había iniciado el estudio por una prueba de cribado no tranquilizadora. En 25 pacientes (42%) la lesión era indetectable mediante exploración física.

La localización de la lesión presentó una distribución relativamente homogénea con respecto a la lateralidad, apareciendo en 28 pacientes (47%) en la mama derecha y en 32 (53%) en la mama izquierda; no se diagnosticó ningún cáncer de mama bilateral en la muestra. Hasta el 40% de las pacientes presentaron la lesión en el cuadrante supero-externo de la mama (CSE) por tanto fue mucho más frecuente esta localización que cualquier otro cuadrante o el área retroareolar como se representa en la *Figura 11*.

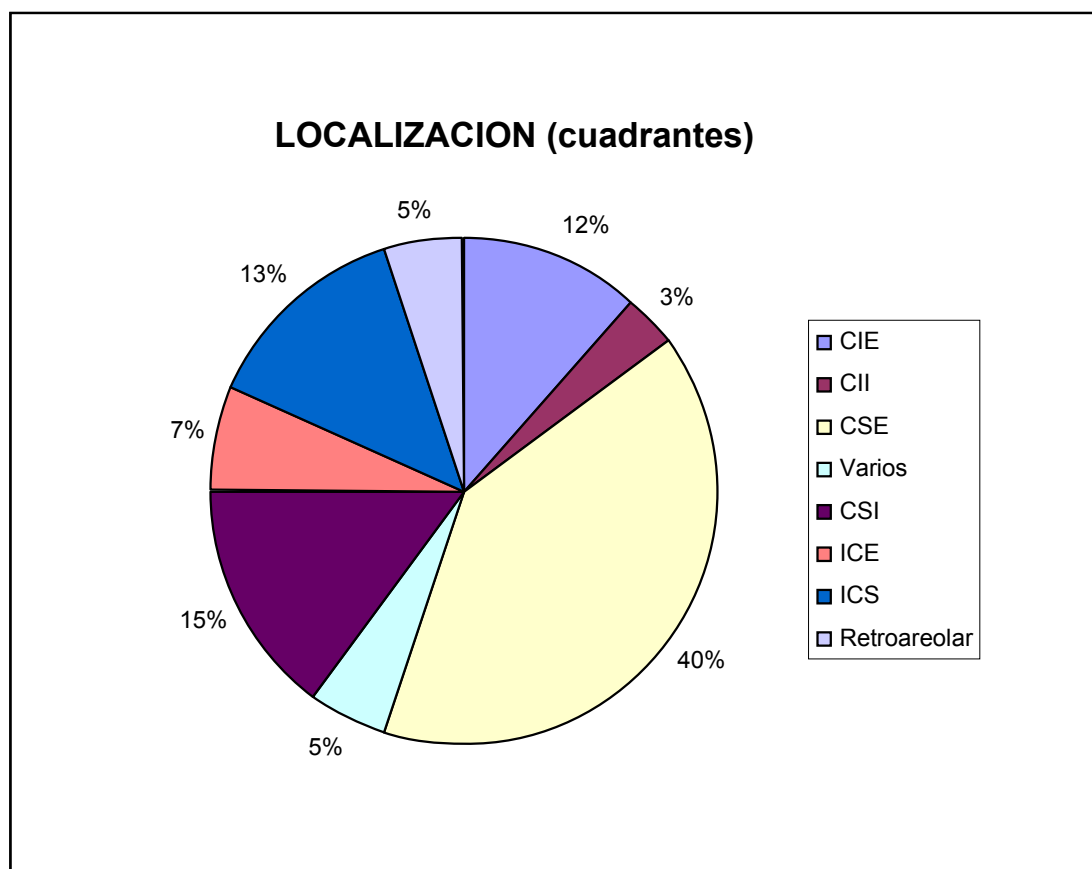


Figura 11. Localización de la lesión en la mama.

El motivo de consulta o hallazgo inicial tras el cual se llegó hasta el diagnóstico de cáncer de mama fue clínico en el 52% de las pacientes, es decir, por detección de una lesión por parte de la paciente o por una exploración mamaria rutinaria por parte del ginecólogo. El 48% de los diagnósticos se realizaron a partir de pruebas de imagen realizadas como cribado, en concreto el 43% fueron estudios mamográficos y el 5% ecográficos.

I.A.6 Técnicas de imagen

La mamografía, la ecografía y la resonancia magnética son las pruebas de imagen que se realizaron para llegar al diagnóstico. Tabla 14.

Se realizó mamografía al 98,3% de las pacientes (59 pacientes). El tipo de hallazgo más frecuente en la mamografía es un nódulo de características sospechosas, seguido de microcalcificaciones, como se muestra en la *Figura 12*.

La mamografía fue realizada a todas las pacientes del estudio, con una excepción, una paciente en seguimiento estricto por antecedentes personales de cáncer de colon y endometrio que fue diagnosticada de cáncer de mama directamente por resonancia magnética. En una sola de las pacientes (1,7%) la mamografía aparece informada como BIRADS II (*Breast Imaging Report and Database System*), es decir, la lesión no es detectable por mamografía y en un 5% la lesión fue clasificada inicialmente como BIRADS III, probablemente benigna, aunque al ser complementada con ecografía o biopsia se llegó al diagnóstico de carcinoma.

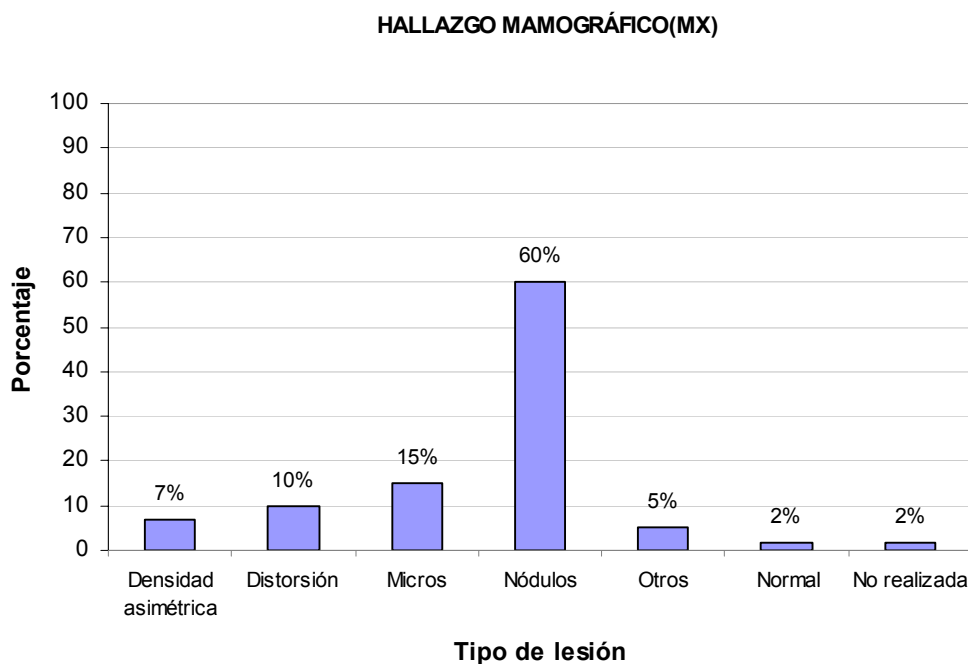


Figura 12. Tipo de lesión en hallazgo mamográfico.

La ecografía se realizó como complemento a la mamografía en el 90% de las pacientes. La resonancia se reservó a pacientes jóvenes o con mamas densas con objeto de descartar una posible multicentricidad o multifocalidad por lo que se indicó en un 38% de las pacientes. *Figura 13.*

El 25% de los casos (15 pacientes) presentaron diagnóstico de multicentricidad (varias lesiones tumorales en diferentes cuadrantes de la mama) o multifocalidad (varias lesiones tumorales en el mismo cuadrante de la mama). Tabla 14.

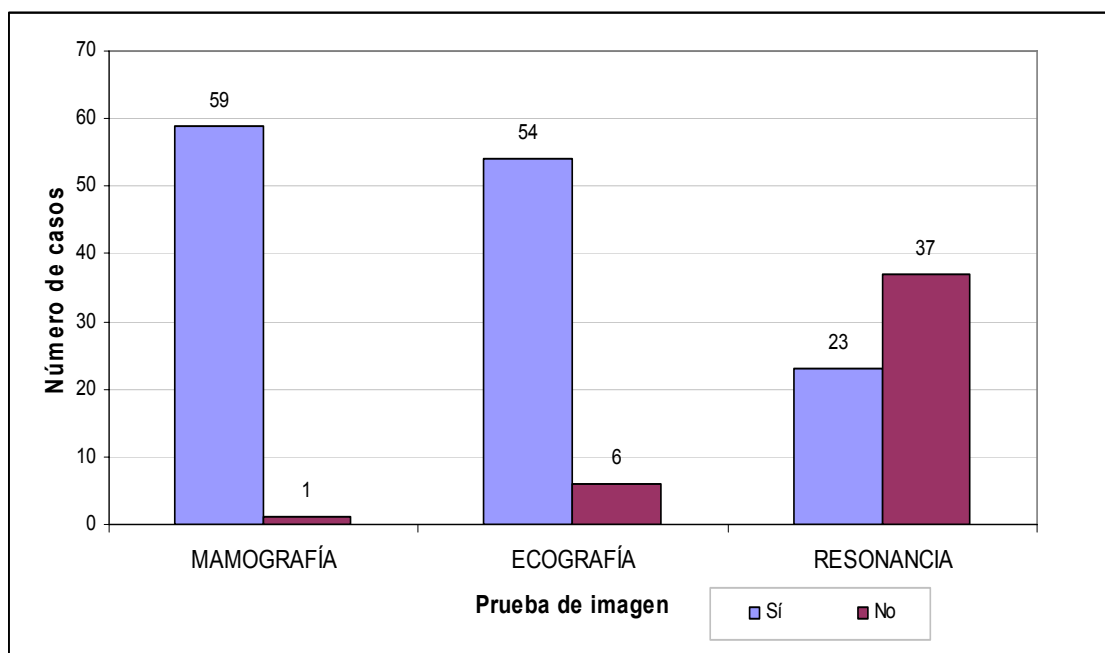


Figura 13. Tipo de técnica de imagen realizada, porcentajes.

Tabla 14. Estudio Descriptivo. Características del tumor y técnicas de imagen.

		Recuento	%	N válido
Palpable	Sí	35	58,3%	60
	No	25	41,7%	
	Total			
Lateralidad	Derecha	28	46,7%	60
	Izquierda	32	53,3%	
	Total			
Localización	CIE	8	13,3%	60
	CII	2	3,3%	
	CSE	23	38,3%	
	Varios	3	5,0%	
	CSI	9	15,0%	
	ICE	4	6,7%	
	ICS	8	13,3%	
	Retroareolar	3	5,0%	
	Total			
Método Hallazgo	Clínico	31	51,7%	60
	Mamografía	26	43,3%	
	Ecografía	3	5,0%	
	Total			
Hallazgo Mamografico	No	1	1,7%	60
	Densidad asimétrica	4	6,7%	
	Distorsión	6	10,0%	
	Micros	9	15,0%	
	Nódulos	36	60,0%	
	Normal	1	1,7%	
	Otros	3	5,0%	
	Total			
Realización de Ecografía	Sí	54	90,0%	60
	No	6	10,0%	
	Total			
BIRADS	0	5	8,3%	60
	II	1	1,7%	
	III	3	5,0%	
	IV	41	68,3%	
	V	10	16,7%	
	Total			
Multifocalidad/ Multicentricidad	Sí	15	25,0%	60
	No	45	75,0%	
	Total			

I.A.7 Técnicas invasivas de diagnóstico cito-histológico

El diagnóstico definitivo es anatomopatológico. En el estudio, el 36,7% de las pacientes fueron diagnosticadas mediante *biopsia con aguja gruesa* (BAG). En el 41,7% de las pacientes se obtuvo un resultado sospechoso tras una *punción-aspiración con aguja fina* (PAAF), concordante con la clínica o las pruebas de imagen, por lo que se indicó una cirugía con estudio intraoperatorio de infiltración tumoral y se confirmó dicho diagnóstico. Por último, en 13 pacientes (21,7%) los resultados cito-histológicos de la PAAF/BAG no detectaron enfermedad a pesar de la clínica o las técnicas de imagen sospechosas; debido a esta disociación de resultados se indicó una biopsia quirúrgica y se llegó al diagnóstico final de cáncer de mama. *Figura 14. Tabla 15.*

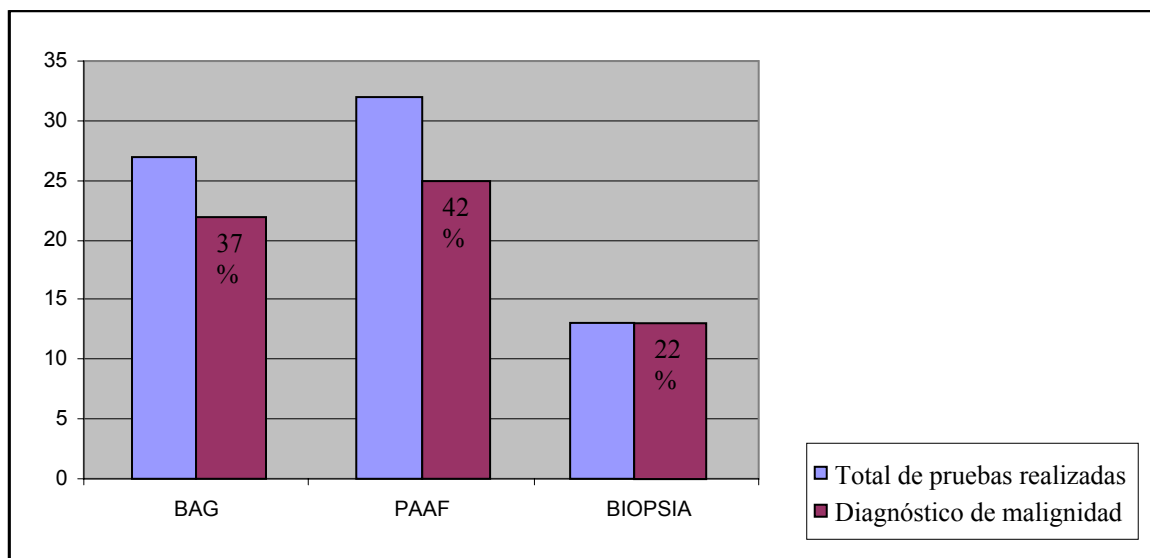


Figura 14. Técnicas de diagnóstico cito-histológico realizadas y porcentaje de diagnóstico de malignidad con cada una de ellas.

Tabla 15. Estudio Descriptivo. Técnicas invasivas de diagnóstico cito-histológico.

		Recuento	%	N válido
PAAF (si/no)	Sí	32	53,3%	60
	No	28	46,7%	
	Total			
PAAF (Resultado)	No realizado	28	46,7%	60
	Benigna	7	11,7%	
	Maligna	25	41,7%	
	Total			
BAG (si/no)	Sí	27	45,0%	60
	No	33	55,0%	
	Total			
BAG (Resultado)	No realizado	33	55,0%	60
	Benigna	5	8,3%	
	Maligna	22	36,7%	
	Total			
Técnica de diagnóstico	BAG	22	36,7%	60
	Biopsia	13	21,7%	
	PAAF	25	41,7%	
	Total			

I.A.8 Tipo de cirugía

El tipo de cirugía realizada depende del diagnóstico prequirúrgico. La intención inicial es la indicación de cirugía conservadora en el mayor número posible de casos; en la muestra se realizó un tratamiento completo con cirugía conservadora en el 63% de los casos y fue necesaria la mastectomía en un 35%. En un caso la cirugía consistió en una ampliación de márgenes tras un hallazgo extraclínico de nódulo maligno durante un recambio de prótesis mamarias en un centro de estética. En todos los casos se realizó una biopsia de ganglio centinela. Tabla 16.

La causa de cirugía radical es en la mayoría de los casos la multicentricidad, seguida de un tamaño tumoral que exceda la proporción tumor-mama mayor de 2/3 o detección de carcinoma in situ extenso acompañante (2 casos); finalmente se indicó cirugía radical en 2 casos por deseo de la paciente debido a cancerofobia o a negación al tratamiento radioterápico. De los casos de multifocalidad, sólo en 2 casos fue posible hacer una cirugía completa conservadora por estar las lesiones en el mismo cuadrante y ser la mama suficientemente grande para una resección completa con márgenes libres. *Figura 15.*

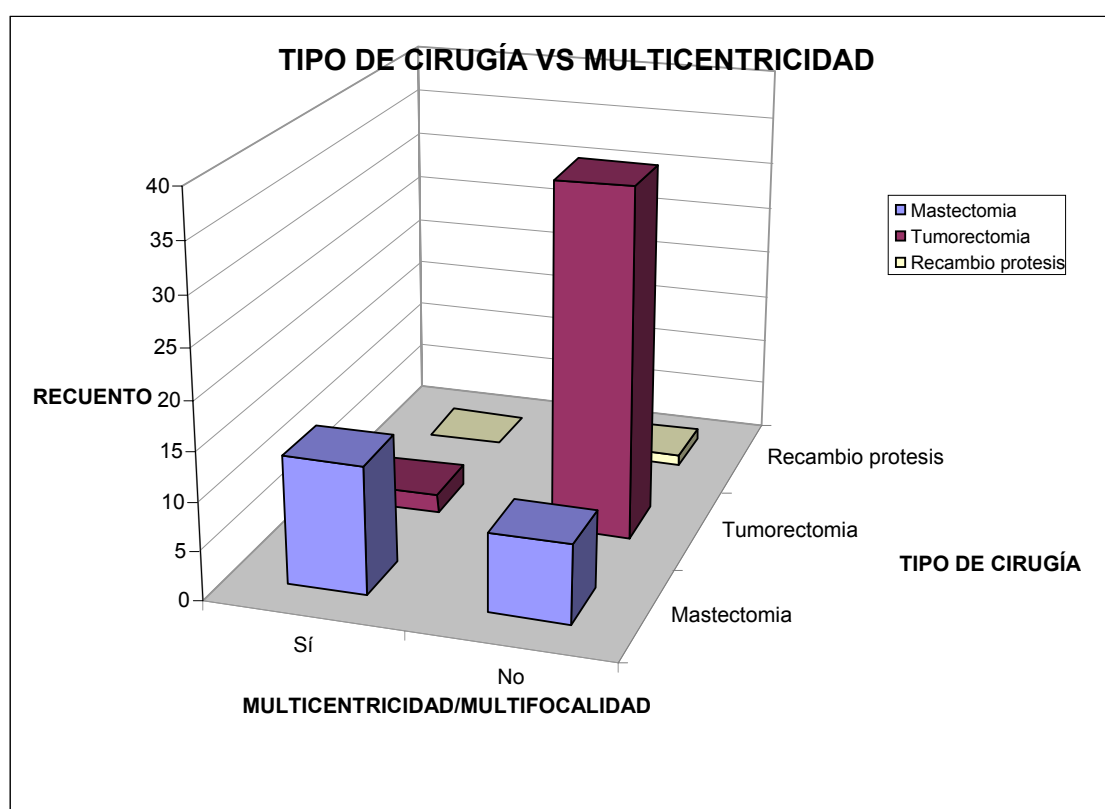


Figura 15. Tipo de cirugía indicado y relación con multicentricidad.

I.A.9 Número de cirugías

Para conseguir la exéresis de todo el tejido tumoral con márgenes libres, fue necesario realizar 2 cirugías en un 27% de los casos. Esta indicación fue debida, en 10 casos (16%), a la necesidad inicial de una biopsia quirúrgica para el diagnóstico de cáncer de mama y en un segundo tiempo el tratamiento oncológico completo. O bien, en 5 casos (8%), por presentar márgenes afectados en la anatomía patológica definitiva que precisaron ampliación de márgenes. Una paciente (1,7%) precisó reintervención por hematoma en el lecho quirúrgico. *Figura 16.* Tabla 16.

Se indicó el marcaje radioguiado por arpón previo a la intervención en un 40% de los casos por lesiones no palpables o de mala limitación.

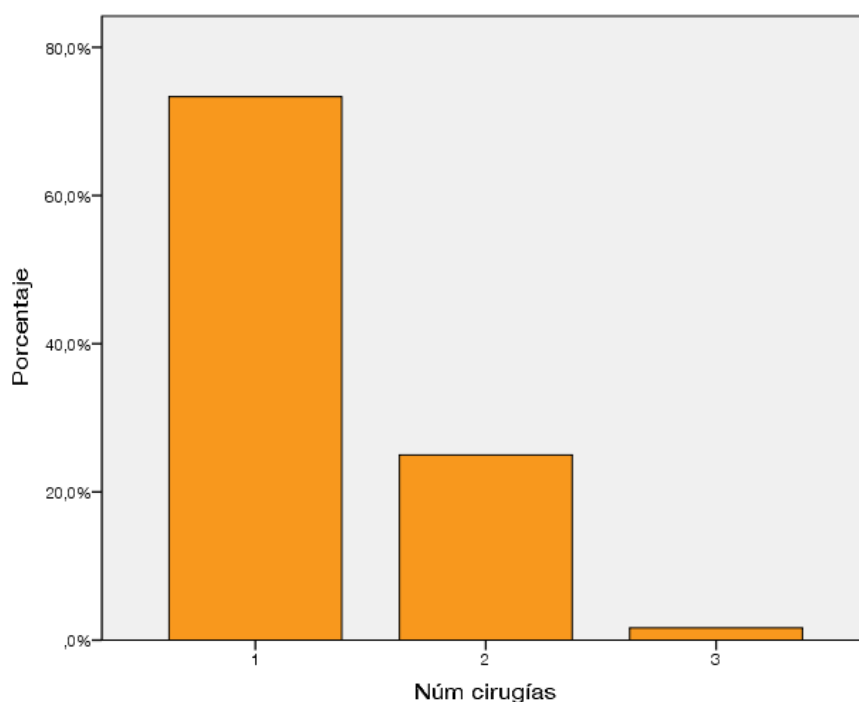


Figura 16. Número de cirugías realizadas por paciente.

I.A.10 Ganglio centinela

El resultado intraoperatorio del ganglio centinela coincidió en nuestro estudio en con el diagnóstico definitivo del mismo en todos los casos, por lo que no fue preciso hacer ninguna linfadenectomía en una segunda cirugía. La migración del isótopo fue efectiva en todos los casos y no hubo ninguna migración hacia la cadena linfática de la mamaria interna. Tabla 16.

En 10 casos (17,6%) la biopsia intraoperatoria del ganglio centinela resultó positiva para malignidad por lo que se realizó linfadenectomía en el mismo acto quirúrgico. *Figura 17.*

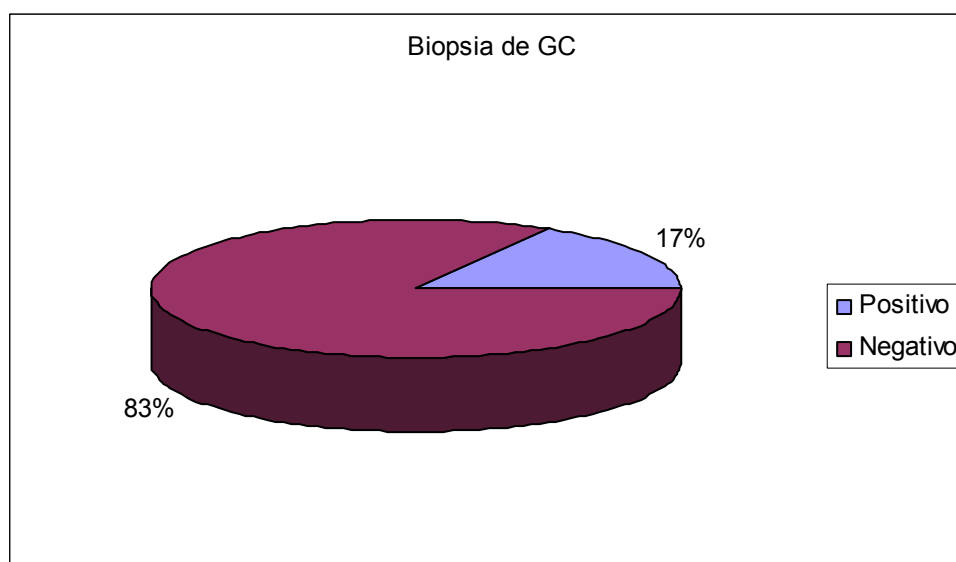


Figura 17. Resultado histológico de biopsia de ganglio centinela.

En la muestra se obtuvieron de 1 a 4 ganglios centinela, siendo la mediana 2GC; en el 17 % de las intervenciones fue necesaria la exéresis de más de 2 ganglios. *Figura 18.* De los casos con ganglio centinela positivo, el 80% (8 casos) presentaron sólo un ganglio centinela positivo. *Figura 19.*

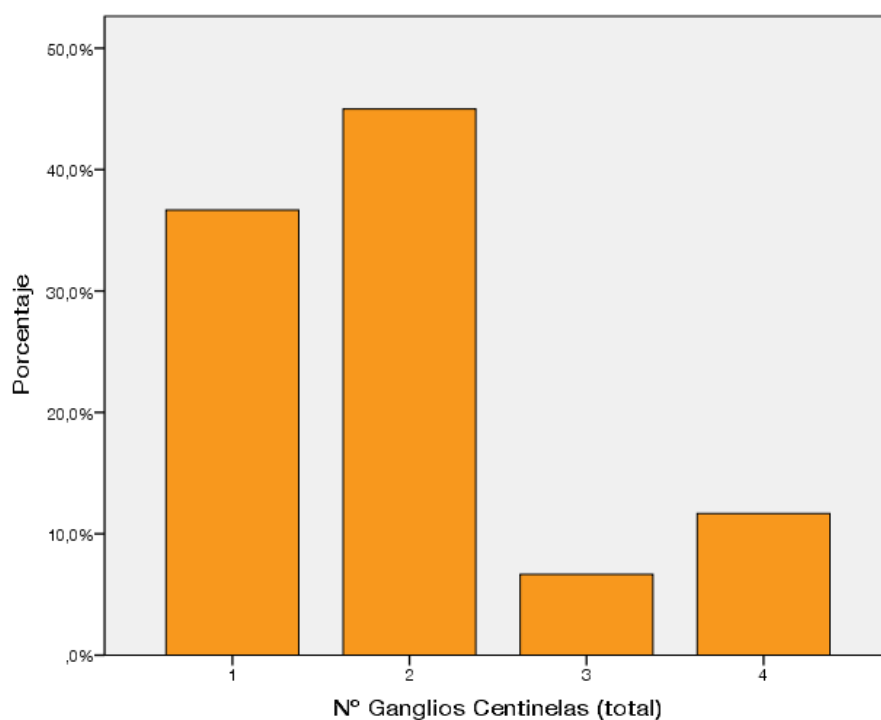


Figura 18. Número de ganglios centinela resecados.

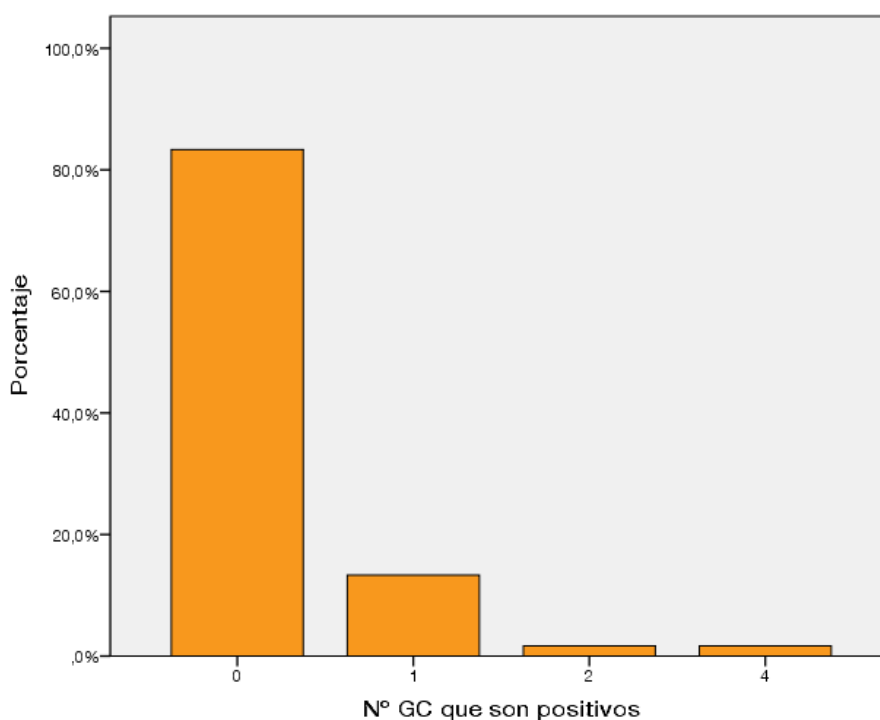


Figura 19. Número de ganglios centinela positivos

I.A.11 Linfadenectomía

Se realizó linfadenectomía axilar en 14 pacientes (23%), 10 de ellas por biopsia de ganglio centinela positivo (17%) y las 4 restantes por sospecha clínica de afectación de ganglios no centinela durante la intervención, a pesar de resultado de ganglio centinela negativo. De éstas sólo en un caso se constató la afectación ganglionar y éste presentó únicamente 1 ganglio afectado. Por tanto sólo hubo un falso negativo a corto plazo en la técnica de la biopsia de ganglio centinela (1,6%).

En conjunto, 11 pacientes (18,3%) presentaron afectación ganglionar en el diagnóstico definitivo.

En el 90% de las pacientes con BGC positivo, ningún ganglio no centinela presentó afectación. Se debe indicar que uno de estos casos presentó 4 ganglios centinela positivos para malignidad aunque posteriormente en la linfadenectomía diferida ninguno de los ganglios obtenidos presentase metástasis.

Al cuantificar el número total de ganglios afectos tras sumar los centinela y los hallados en la linfadenectomía, de las 10 pacientes con biopsia de ganglio centinela positivo, 7 pacientes (70%) presentaron un solo ganglio afectado, una (10%) presentó 2 ganglios afectados y 2 (20%) presentaron 4 ganglios afectados. *Figura 20.* Tabla 16.

El tamaño de la metástasis en el ganglio centinela (6,8mm de Media, Desviación Típica 4,7mm) no demostró tener relación con el número de ganglios afectados en la linfadenectomía. No hubo ningún caso de micrometástasis (acúmulo celular de menos de 2mm en ganglio).

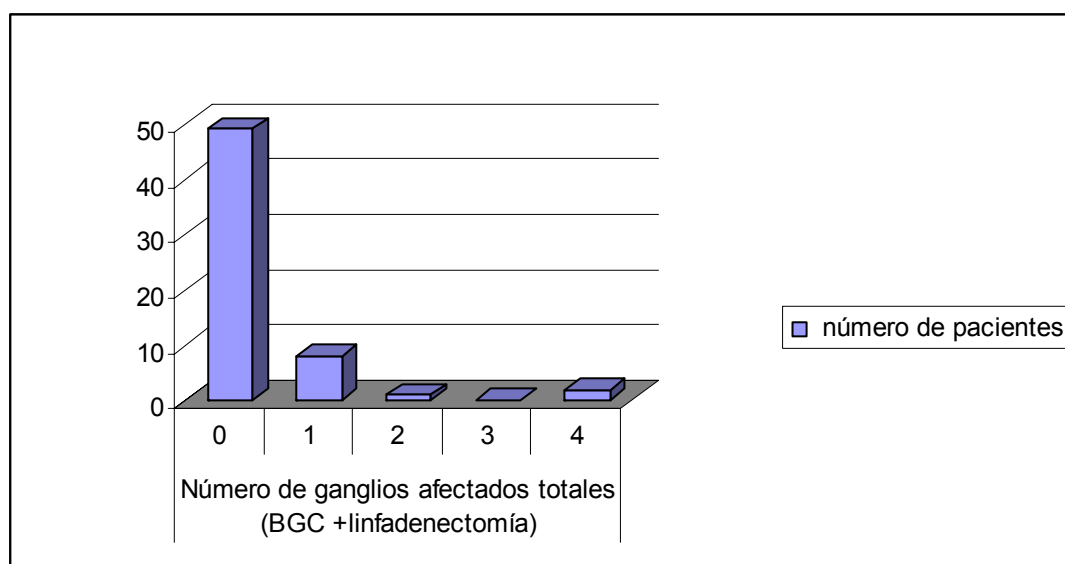


Figura 20. Número de Ganglios con metástasis (ganglios positivos en BGC+ ganglios positivos en estudio diferido de linfadenectomía)

Tabla 16. Estudio Descriptivo. Datos quirúrgicos.

		Recuento	%	N válido
Tipo de Cirugía	Mastectomía	21	35,0%	60
	Tumorectomía	38	63,3%	
	Recambio prótesis	1	1,7%	
	Total			
Número de Cirugías	1	44	73,3%	60
	2	15	25,0%	
	3	1	1,7%	
	Total			
Indicación de Arpón	Sí	24	40,0%	60
	No	36	60,0%	
	Total			
Biopsia de Ganglio Centinela	Positivo	10	16,7%	60
	Negativo	50	83,3%	
	Total			
Número de Ganglios Centinela Obtenidos	1	22	36,7%	60
	2	27	45,0%	
	3	4	6,7%	
	4	7	11,7%	
	Total			
Número de Ganglios Centinela Positivos	0	50	83,3%	60
	1	8	13,3%	
	2	1	1,7%	
	4	1	1,7%	
	Total			
Afectación ganglionar diagnóstico definitivo	Sí	11	18,3%	60
	No	49	81,7%	
	Total			
Linfadenectomía	Sí	14	23,3%	60
	No	46	76,7%	
	Total			
Numero de ganglios afectados (BGC +linfadenectomía)	0	49	81,6%	60
	1	8	13,3%	
	2	1	1,6%	
	3	0	0	
	4	2	3,3%	
	Total			
Tamaño de la Metástasis del Ganglio Centinela	≤2mm	50	83,3%	60
	>2mm	10	16,7%	
	Total			

I.A.12 Anatomía patológica de la pieza quirúrgica

El informe anatomopatológico definitivo nos da información vital para la estadificación, el pronóstico y el posterior tratamiento del cáncer de mama. Se informa del tamaño tumoral, del grado histológico, de la estirpe tumoral y de la presencia de componente in situ en la pieza remitida para estudio. En la pieza quirúrgica también se estudian otros marcadores como receptores inmuno-histoquímicos e índices mitóticos. Tabla 18.

En nuestro estudio el tamaño tumoral fue de 17mm de media, con una distribución según la clasificación TNM como se muestra en las *Figura 22*. El 70% fue clasificado como T1, menor de 2 cm y el 30% como T2, entre 2 y 5 cm. No se encontró ningún caso de tamaño tumoral mayor de 5cm, T3, en la muestra.

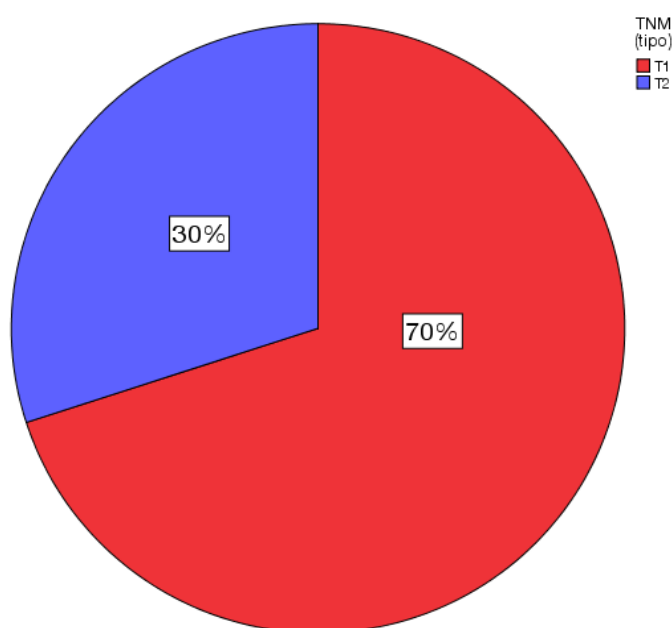


Figura 21. Tamaño tumoral, clasificación TNM.

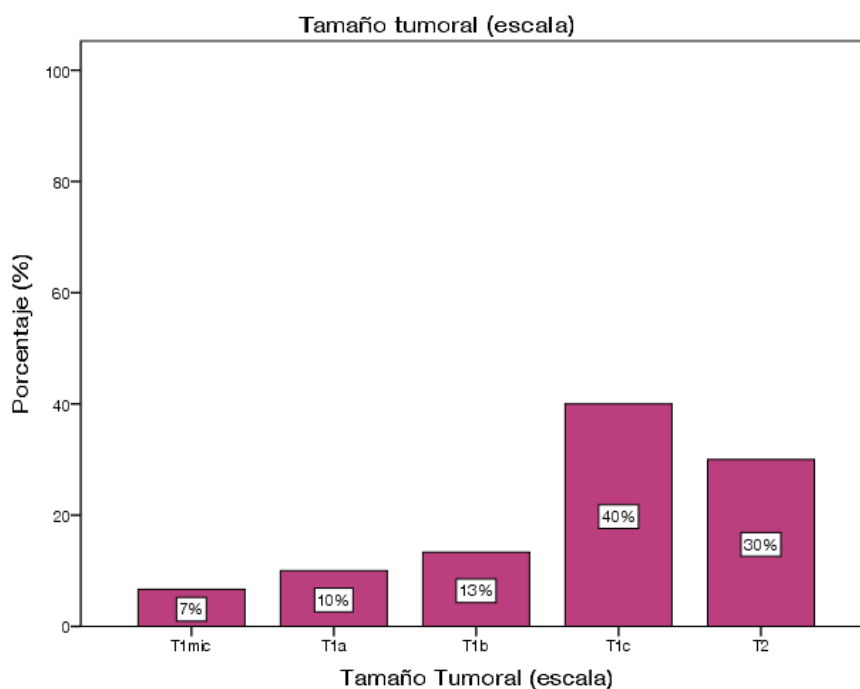


Figura 22. Tamaño tumoral, clasificación TNM. Subtipos.

El grado histológico tumoral fue mayoritariamente G2, (53%), y presentó componente in situ en un 23% de los casos.

La estirpe tumoral mayoritaria es el carcinoma ductal infiltrante (70%) seguido de carcinoma lobulillar (10%). En la *Figura 23* se muestra la frecuencia de casos por estirpe tumoral.

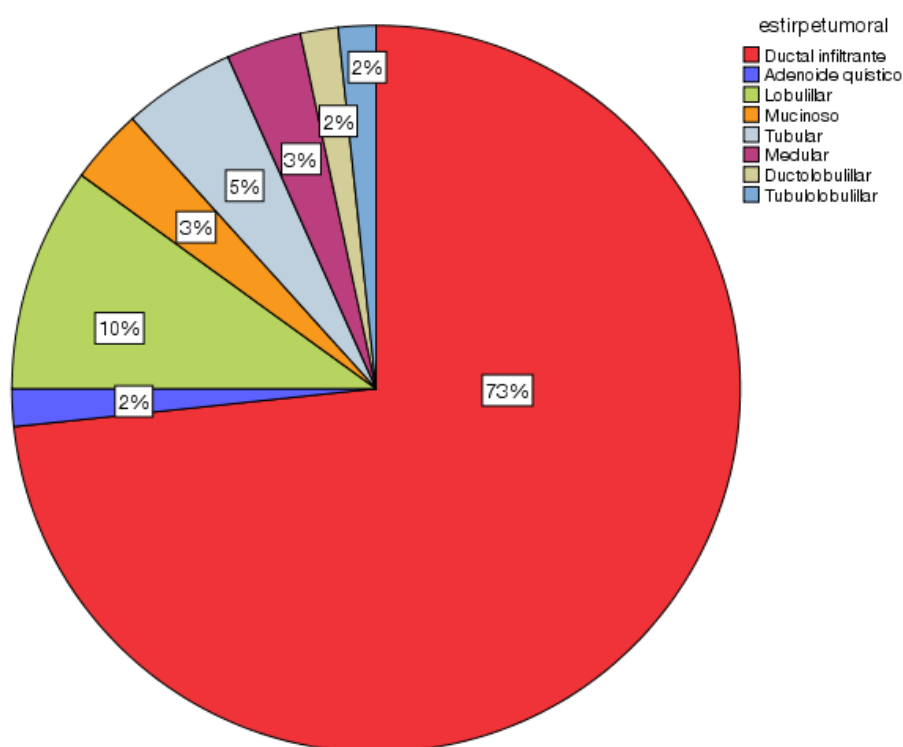


Figura 23. Estirpe tumoral por porcentajes

I.A.13 Receptores hormonales

En la muestra, se clasificaron los tumores según presentasen receptores hormonales en menos del 25% de las células (considerados negativos), entre 25-50% de las células, 50-75% o más del 75%. El 12% de pacientes presentaron valores negativos para receptores estrogénicos y el 17% valores negativos para receptores de progesterona. Un 65% presentaron receptores estrogénicos en más del 75% de las células y un 57% presentaron receptor de progesterona en más del 75% de las células. *Figura 24.*

I.A.14 HER2-Neu

La detección de la expresión del oncogen HER2 se llevó a cabo por inmunohistoquímica (dosis de proteína expresada por el mismo) y, en los casos de expresión intermedia o niveles dudosos, se realizó una comprobación por FISH (Florescent In Situ Hibridation) reclasificando de esta manera a los tumores como positivo o negativo para la expresión de HER2. Tabla 17. En este estudio, 8 pacientes (13%) presentaron tumores HER2 positivos, hallados por positividad mayor del 75% en la inmunohistoquímica o por FISH positivo. *Figura 24.*

Tabla 17. Clasificación de expresión de Her 2 neu.

Clasificación	Patrón de inmunohistoquímica	Her2/Neu estatus	FISH
0	Inmunomarcación negativa o positiva en menos del 10% de las células tumorales.	Negativo	
1+	Reacción débil. En más del 10% de las células tumorales.	Negativo	
2+	Reacción débil a moderada. En más del 10% de las células tumorales.	Positividad débil	Indicado: positivo o negativo
3+	Reacción fuerte y completa. Marca todo el contorno de la membrana en más e 10% de las células tumorales.	Positividad fuerte	

I.A.15 Ki67

Por último, se realizó en todos los casos una estimación del Ki 67 asociado a baja diferenciación celular, invasión vascular y estatus axilar. En la muestra se obtuvieron un 60% de los cánceres de mama con una estimación de Ki67 baja (menor del 25%). *Figura 24.*

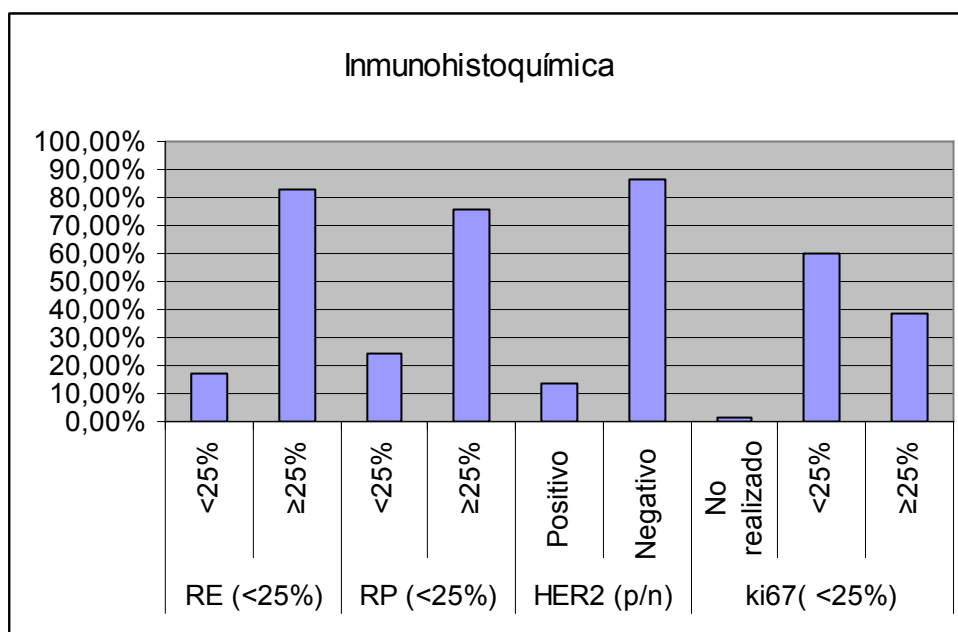


Figura 24. Resultados del análisis de la inmunohistoquímica de los tumores en la muestra.

Tabla 18. Estudio descriptivo. Resultados de Anatomía Patológica.

		Recuento	%	N válido
Clasificación TNM	T1	42	70,0%	60
	T2	18	30,0%	
	T3	0	0,0%	
	Total			
Clasificación TNM (subtipo)	T1mic	4	9,5%	60
	T1a	6	14,3%	
	T1b	8	19,0%	
	T1c	24	57,1%	
	T2	18	30,0%	
	Total			
Tipo Histológico definitivo	Ductal infiltrante	43	71,7%	60
	Adenoide quístico	1	1,7%	
	Lobulillar	11	18,3%	
	Mucinoso	2	3,3%	
	Tubular	1	1,7%	
	Medular	0	0,0%	
	Ductolobulillar	1	1,7%	
	Tubulolobulillar	1	1,7%	
	Total			
Tipo Histológico (agrupado)	Ductal infiltrante	43	71,7%	60
	Lobulillar	11	18,3%	
	Otros	6	10,0%	
	Total			
Grado tumoral de Elston	G1	16	27,6%	58
	G2	32	55,2%	
	G3	10	17,2%	
	Total			
Presencia de Componente in situ	Sí	15	25,0%	60
	No	45	75,0%	
	Total			
Receptores Estrógeno	<25%	10	16,9%	59
	≥25%	49	83,1%	
	Total			
Receptores Progesterona	<25%	14	24,1%	58
	≥25%	44	75,9%	
	Total			
HER2 (p/n)	Positivo (≥75% & FISH+)	8	13,3%	60
	Negativo	52	86,7%	
	Total			
ki67	No realizado	1	1,7%	60
	<25%	36	60,0%	
	≥25%	23	38,3%	
	Total			

I.A.16 Tratamiento Adyuvante

El tratamiento sistémico posterior se instauró según los protocolos del servicio de oncología del Hospital Clínico San Carlos acorde al resultado histológico definitivo de la pieza quirúrgica, del ganglio centinela y de las características de cada paciente.

La indicación de quimioterapia es compleja y depende fundamentalmente del cálculo de riesgo de recidiva; se indicó en el 40% de las pacientes del estudio.

El tratamiento radioterápico se indicó, según los protocolos del servicio de radioterapia, al 62% de las pacientes del estudio. Se prescribió en todos los casos de cirugía conservadora y en aquellos casos de riesgo alto de recidiva local, siempre y cuando no hubiera contraindicación de radioterapia,

Se indicó hormonoterapia a todas las pacientes que presentaron receptores hormonales en el estudio inmunohistoquímico (83%).

Las proporciones de indicación de tratamiento adyuvante se resumen en la Tabla 19 y la *Figura 25*.

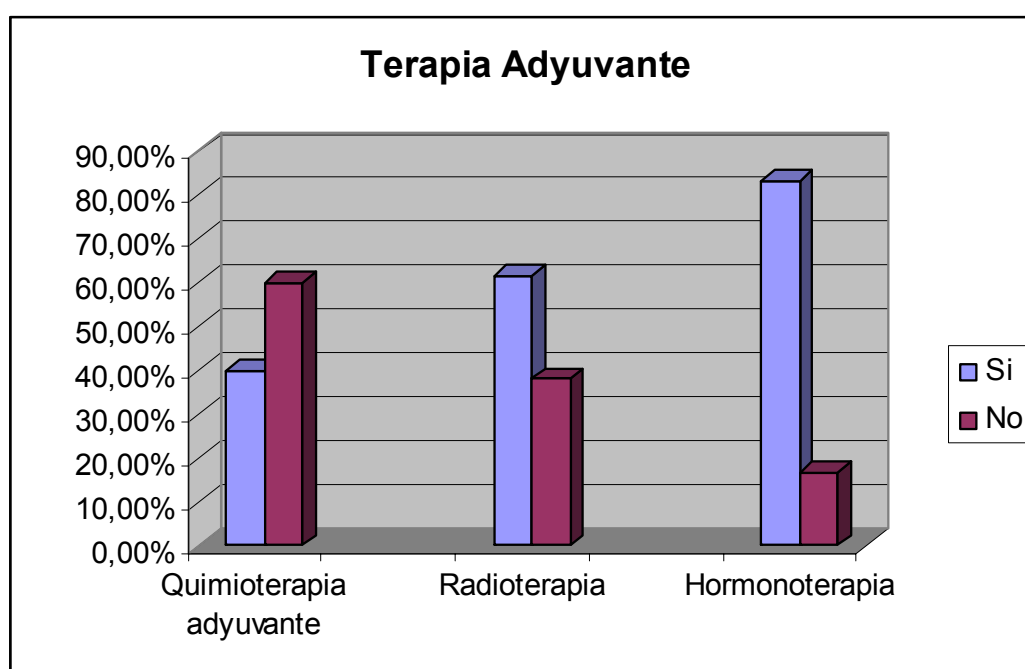


Figura 25. Terapias Adyuvantes. Porcentaje pacientes tratadas con Quimioterapia, Radioterapia y Hormonoterapia.

Tabla 19. Estudio Descriptivo. Tratamiento Adyuvante.

		Recuento	%	N válido
Quimioterapia adyuvante	Sí	24	40,0%	60
	No	36	60,0%	
	Total			
Radioterapia	Si	37	61,7%	60
	No	23	38,3%	
	Total			
Hormonoterapia	Sí	50	83,3%	60
	No	10	16,7%	
	Total			

I.B. ESTUDIO DESCRIPTIVO DEL ANÁLISIS MOLECULAR DEL GANGLIO CENTINELA: MAMOGLOBINA Y CITOQUERATINA 19

Se estudió la presencia de citokeratina 19 y de mamoglobina en el ganglio centinela. Los resultados fueron positivos en 6 pacientes (10%) para citoqueratina y 5 pacientes (8,3%) para mamoglobina. En conjunto, 7 pacientes de la muestra (11,7%) presentaron positividad en el ganglio centinela mediante detección por PCR (MG y/o CK19). Tabla 20. *Figura 26.*

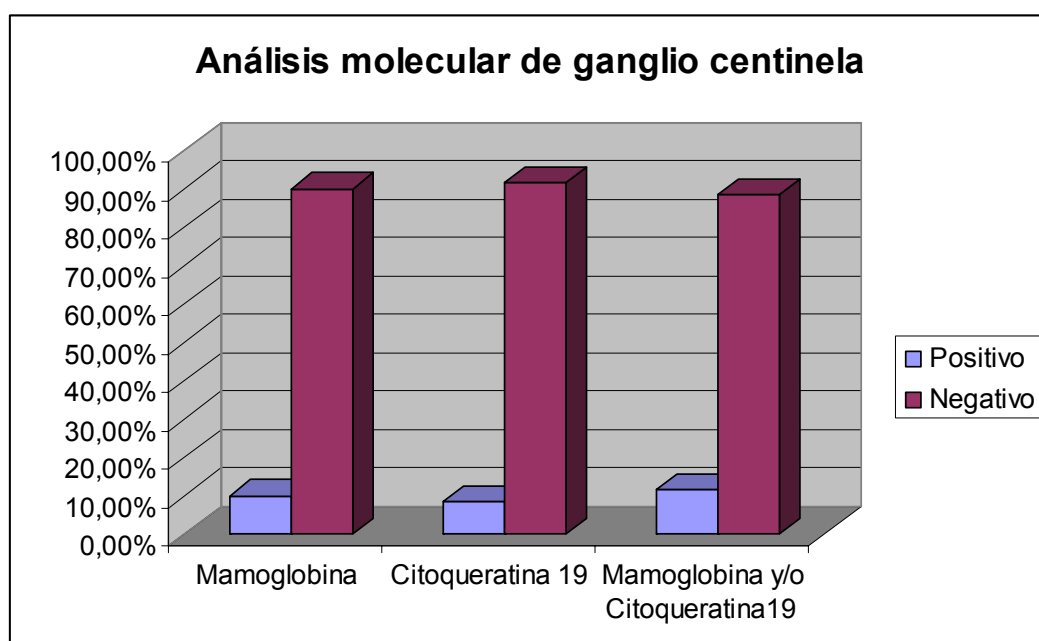


Figura 26. Análisis molecular de ganglio centinela, porcentaje de valores positivos de mamoglobina, citoqueratina 19 o ambas en ganglio centinela.

Tabla 20. Estudio Descriptivo. Estudio molecular del Ganglio Centinela.

		Recuento	%	N válido
Mamoglobina	Positivo	6	10,0%	60
	Negativo	54	90,0%	
	Total			
Citoqueratina 19	Positivo	5	8,3%	60
	Negativo	55	91,7%	
	Total			
Mamoglobina y/o Citoqueratina 19	Positivo	7	11,7%	60
	Negativo	53	88,3%	
	Total			

I.C. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LA DETECCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES

Como punto fundamental de este trabajo, se realizó el estudio de la detección de Células Tumorales Circulantes en sangre periférica. 0.

La detección realizada antes de la cirugía se denomina CTC prequirúrgica o CTC1; la realizada dentro de las 10 horas posteriores a la cirugía, se denomina CTC postquirúrgica o CTC2.

Los valores de CTC hallados se clasificaron de dos maneras:

- Clasificación en tres rangos: $CTC=0$, $CTC= 1-4$ o $CTC \geq 5$. De esta manera, se consideraron como positivos los valores de CTC mayor o igual a 1 ($CTC \geq 1$) y se buscaron los casos de $CTC \geq 5$, considerado punto de corte en los estudios de referencia en cáncer de mama metastásico.
- Clasificación por CTC menor a 2 versus mayor o igual a 2, ($CTC < 2$ vs $CTC \geq 2$) considerando como positivas $CTC \geq 2$.

El estudio, en adelante, toma como referencia la primera clasificación y considera, por tanto, como positivo la detección de $CTC \geq 1$.

Ninguna de las pacientes del estudio, diagnosticadas en todos los casos de cáncer de mama temprano, presentaron niveles iguales o mayores a 5, referencia que se toma en los estudios de cáncer de mama metastático, por lo que no se podría tomar esta cifra como punto de corte en este estudio. La denominación de CTC=1-4 se sustituye en el texto por $CTC \geq 1$ por ser coincidentes al no existir casos de $CTC > 5$.

En el 30,5% de las pacientes de la muestra (18 pacientes) se detectaron CTC antes del acto quirúrgico ($CTC_1 \geq 1$) mientras que en el 69,5% restante (41 pacientes) presentaron valores de $CTC_1 = 0$. De ellas, se encontraron 5 casos (8,5%) de CTC igual o mayor a 2 y en ningún caso se superaron 5 CTC.

En el análisis postquirúrgico de CTC (CTC_2), se obtuvo igualmente un resultado de $CTC_2 \geq 1$ del 30,5% y de $CTC_2 = 0$ del 69,5%, por lo que no se diferenciaron de los hallazgos en la detección prequirúrgica. Sin embargo, en la cuantificación postquirúrgica, únicamente se encuentra $CTC \geq 2$ en 2 pacientes (3,4%), cifra menor que en la cuantificación prequirúrgica. Tampoco superaron en ningún caso la cifra de 5 CTC.

Estos datos se analizaron sobre 59 muestras ya que en un caso hubo un fallo durante el procesamiento de la sangre extraída para la detección de CTC y no fue posible analizarla.

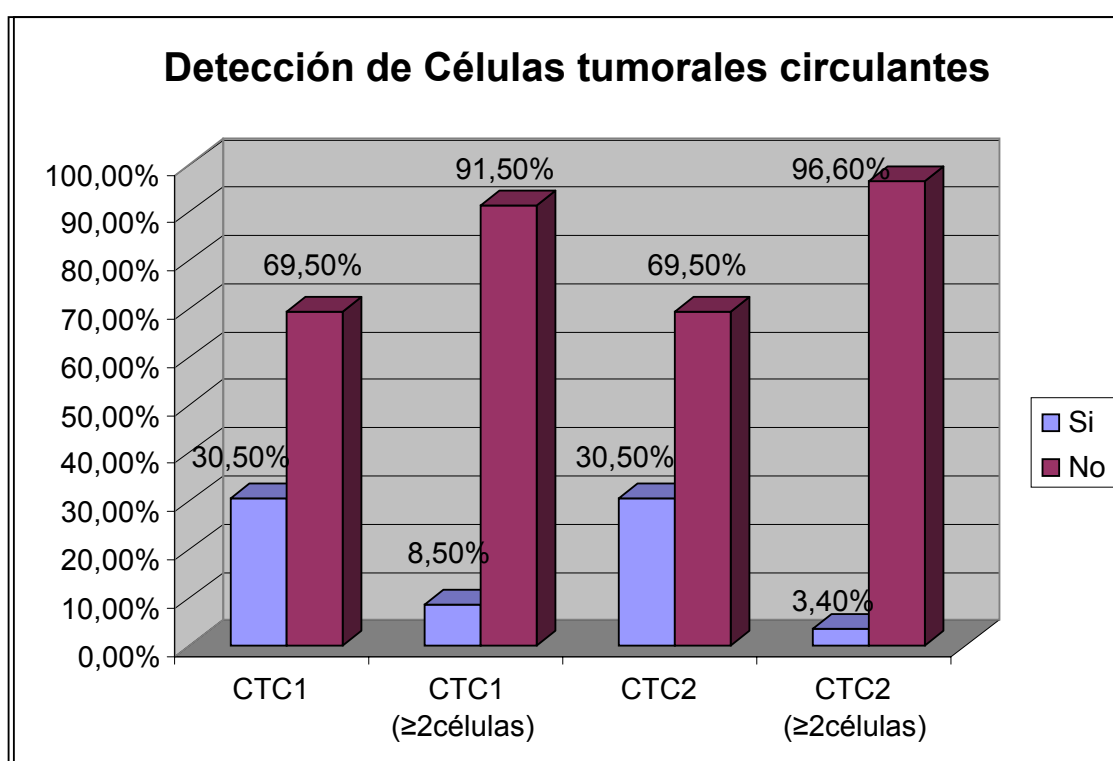


Figura 27. Porcentaje de detección de Células tumorales Circulantes, valores absolutos e iguales o mayores a 2 células. CTC1: valores prequirúrgicos. CTC2: valores postquirúrgicos.

Tabla 21. Estudio Descriptivo. Detección de CTC.

		Recuento	%	N válido
CTC1	No	41	69,5%	59
	Si	18	30,5%	
	Total			
CTC1 (≥2)	≥2 células	5	8,5%	59
	<2 células	54	91,5%	
	Total			
CTC2	No	41	69,5%	59
	Si	18	30,5%	
	Total			
CTC2 (≥2)	≥2 células	2	3,4%	59
	<2 células	57	96,6%	
	Total			
CTC1 (cuantitativas)	0	41	69,5%	59
	1	13	22,0%	
	2	3	5,1%	
	3	2	3,4%	
	Total			
CTC2 (cuantitativas)	0	41	69,5%	59
	1	16	27,1%	
	2	2	3,4%	
	Total			

II. ESTUDIO ANALÍTICO

Se analiza la relación entre las diferentes variables clínicas y el resultado de la detección de células circulantes (CTC) y de Citoqueratina19 y Mamoglobina. En las tablas 22 a 25 se muestran los datos de CTC en relación con las variables clínico-patológicas, factores pronóstico clásicos, inmunohistoquímica e histología del tumor.

II.A. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN Y LA DETECCIÓN DE CTC

II.A.1 Edad

Existe una distribución homogénea en la detección de células tumorales circulantes en los diferentes rangos de edad estudiados en la muestra.

Sin embargo existe una mayor tendencia a presentar CTC1 positivas en pacientes más jóvenes (<50 años, el 35% presentaron CTC+) y mayores (>67 años, un 33%) frente a las pacientes de edades intermedias (50-66 años, 25-27%) de manera no estadísticamente significativa ($p=0,91$).

II.B. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS DEL TUMOR Y LA DETECCIÓN DE CTC

II.B.1 Multifocalidad

Las pacientes con diagnóstico de multifocalidad presentan CTC1 positivas en un 50% de los casos, en cambio, las restantes pacientes de la muestra presentan CTC1 positivas sólo en un 24% de los casos, diferencia estadísticamente no significativa ($p=0,098$ en test exacto de Fisher)

II.B.2 TNM

El 41% de los casos clasificados por su tamaño tumoral como T2 (17 casos) presentan CTC1 positivas, un porcentaje mayor que el encontrado en los casos con tamaño tumoral T1 (42 casos) en los que se se presentan CTC positivas en el 26% de los casos, ($p=0,25$).

Las diferencias en edad, multifocalidad y TNM observadas en CTC1 no se objetivan en el estudio de CTC postquirúrgicas, que presentan una distribución homogénea en relación a estos parámetros.

II.B.3 Estirpe tumoral

Al comparar la detección de CTC prequirúrgicas con los tipos histológicos más frecuentes de cáncer de mama, el resultado es de un 33% de CTC1 positivos en los casos de carcinoma ductal infiltrante frente al 17% entre los casos de carcinoma lobulillar y un 30% en el conjunto de tipos histológicos menos frecuentes, con una relación no estadísticamente significativa.

Existe una diferencia estadísticamente significativa entre la detección de CTC postquirúrgica (CTC2) en los diferentes tipos histológicos tumorales, así en el 37% de los casos de carcinoma ductal infiltrante y en el 33% de los casos de carcinoma lobulillar se detectaron CTC2 positivas, frente a ningún caso de CTC2 positiva en el resto de tipos tumorales ($p=0.017$). *Figura 28.*

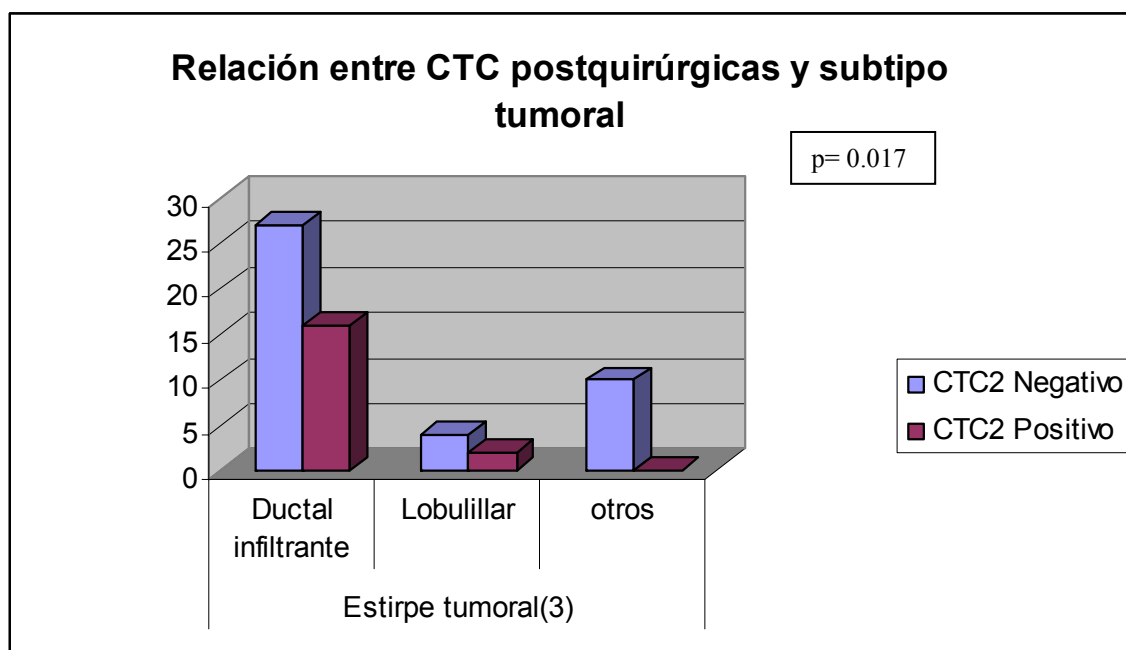


Figura 28. Relación entre células tumorales circulantes en la detección postquirúrgica (CTC2) y el tipo tumoral. Relación estadísticamente significativa.

II.B.4 Grado y componente in situ

No existe ninguna diferencia en la detección de CTC en relación con estos parámetros.

II.C. ESTUDIO ENTRE LA ACTITUD QUIRÚRGICA Y LA DETECCIÓN DE CELULAS TUMORALES CIRCULANTES

Se estudia la relación entre los parámetros de la actitud quirúrgica y la detección de CTC prequirúrgica (CTC1) y postquirúrgica (CTC 2). Las diferencias entre CTC1 y CTC2 se tomaron en consideración para descartar un aumento de la diseminación de Células Tumorales Circulantes debido a los diversos procedimientos quirúrgicos.

II.C.1 Tipo de cirugía

El 40% de las pacientes a las que se les realizó una mastectomía presentaron CTC1 positivas, frente a un 26% de aquellas a las que se le realizó tumorectomía ($p=0,39$). Diferencia no significativa.

La detección postquirúrgica de CTC (CTC2) presenta una distribución semejante entre las pacientes a las que se les realizó mastectomía o tumorectomía, el 35% y 26% respectivamente.

II.C.2 Número de cirugías

El 28% de las pacientes que sólo precisaron una cirugía presentaron CTC1 positivas, dato hallado en el 33% de las pacientes que precisaron 2 cirugías y en la única paciente que precisó tres cirugías (100%) $p=0,27$.

En referencia a la detección postquirúrgica de células circulantes: el 30% de las pacientes que sólo precisaron una cirugía y el 33% de las que precisaron dos cirugías, presentaron CTC2 positivas. No se detectaron CTC2 en la paciente que precisó tres cirugías.

II.D. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA DETECCIÓN DE CTC Y LA BIOPSIA DE GANGLIO CENTINELA

Se observa una mayor frecuencia en la detección de CTC1 en las pacientes con biopsia de ganglio centinela positivo, aunque no presenta significación estadística ($p=0,256$). El 50% de las pacientes con biopsia de ganglio centinela positivo presentaron detección de CTC1, frente al 26% de las pacientes con biopsia de ganglio centinela negativo. *Figura 29.*

Esta diferencia no se presenta en la detección postquirúrgica de CTC, que tiene igual distribución entre pacientes con ganglio centinela positivo y negativo.

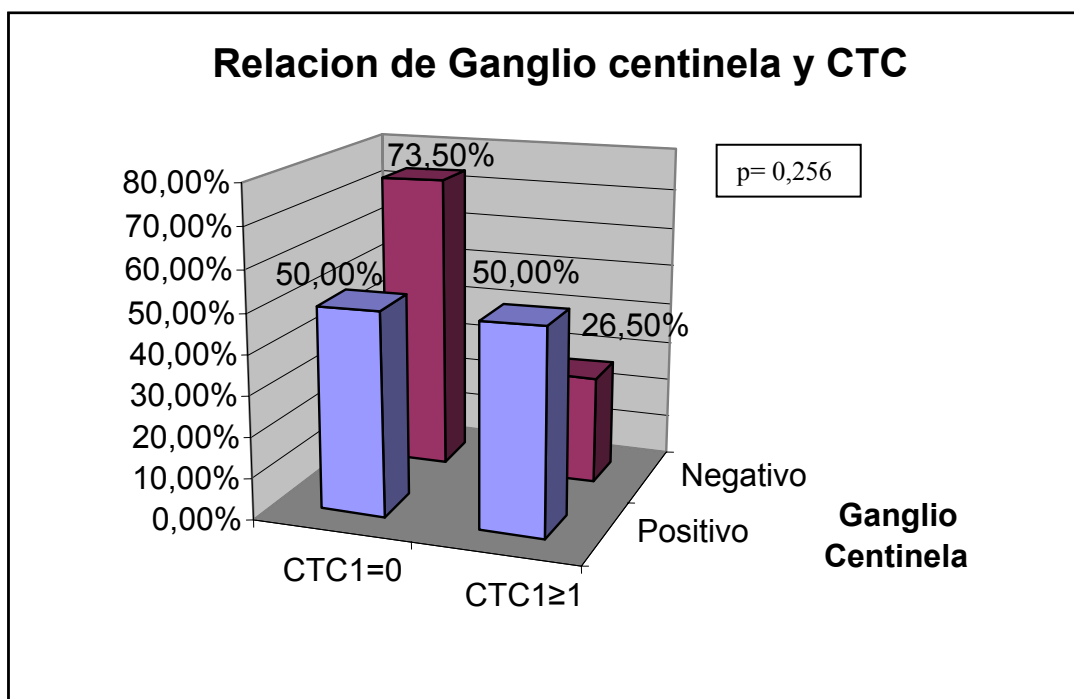


Figura 29. Relación entre el resultado de ganglio centinela y la detección de CTC prequirúrgicas (CTC1).

Teniendo en cuenta las investigaciones sobre la significación de la micrometástasis, se compararon las pacientes con ganglio centinela positivo que presentan metástasis ganglionar mayor de 2 milímetros con aquellas que presentaron metástasis igual o menor a 2mm o sin metástasis. En la muestra no hay casos de micrometástasis, por lo que esta medida coincide con el número de pacientes con ganglio centinela positivo/negativo: el 50% de las pacientes con metástasis ganglionar mayor de 2mm presentaron CTC positivas, frente al 26,5% de las pacientes con metástasis de menor tamaño o sin ella. Diferencia no estadísticamente significativa ($p=0,256$).

El número de ganglios centinela resecados y el número de ganglios centinela positivos para malignidad no presentaron diferencias en relación con la detección de CTC.

En relación con los datos previos, el 43% de las pacientes sometidas a una linfadenectomía presentaron CTC1 positivos frente a un 27% de las pacientes no sometidas a esta técnica. ($p=0,32$). Sin embargo, la distribución es homogénea al comparar la detección de CTC2 (postquirúrgicas) entre las pacientes sometidas a linfadenectomía (36% presentaron CTC2 positivas) y las que sólo fueron sometidas a biopsia ganglionar (29% presentaron CTC2 positivas) $p=0,74$.

II.E. RELACIÓN ENTRE LA DETECCIÓN DE CTC Y LOS HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

Existe relación no estadísticamente significativa entre la detección de CTC y la expresión de receptores hormonales. *Figura 30*. Se observa mayor número de casos de CTC1 positivas entre las pacientes sin expresión de receptores estrogénicos o $RE < 25\%$ (50% de CTC1 positivas) que aquellas con expresión de receptores estrogénicos (25% de CTC1 positivas) $p=0,14$. Esta relación se presenta de forma casi superpuesta comparando la expresión de receptores de progesterona: CTC1 positivas en 46% de pacientes sin expresión de receptores de progesterona frente a 23% en pacientes con mayor expresión de receptores de progesterona. $P=0,16$.

En las pacientes con sobre-expresión del HER2, el 50% presentaron detección de CTC1, a diferencia de la detección de CTC1 en el 27% de las pacientes sin sobre-expresión del mismo. ($p=0,23$).

No se objetivaron diferencias en la detección de CTC1 en relación a la expresión de Ki67, presentando porcentaje similar de CTC1 positivas (30%) en los casos de Ki67 menor y mayor al 25%.

Tampoco se objetivaron diferencias entre la detección de CTC postquirúrgicas y los datos de inmunohistoquímica de la muestra.

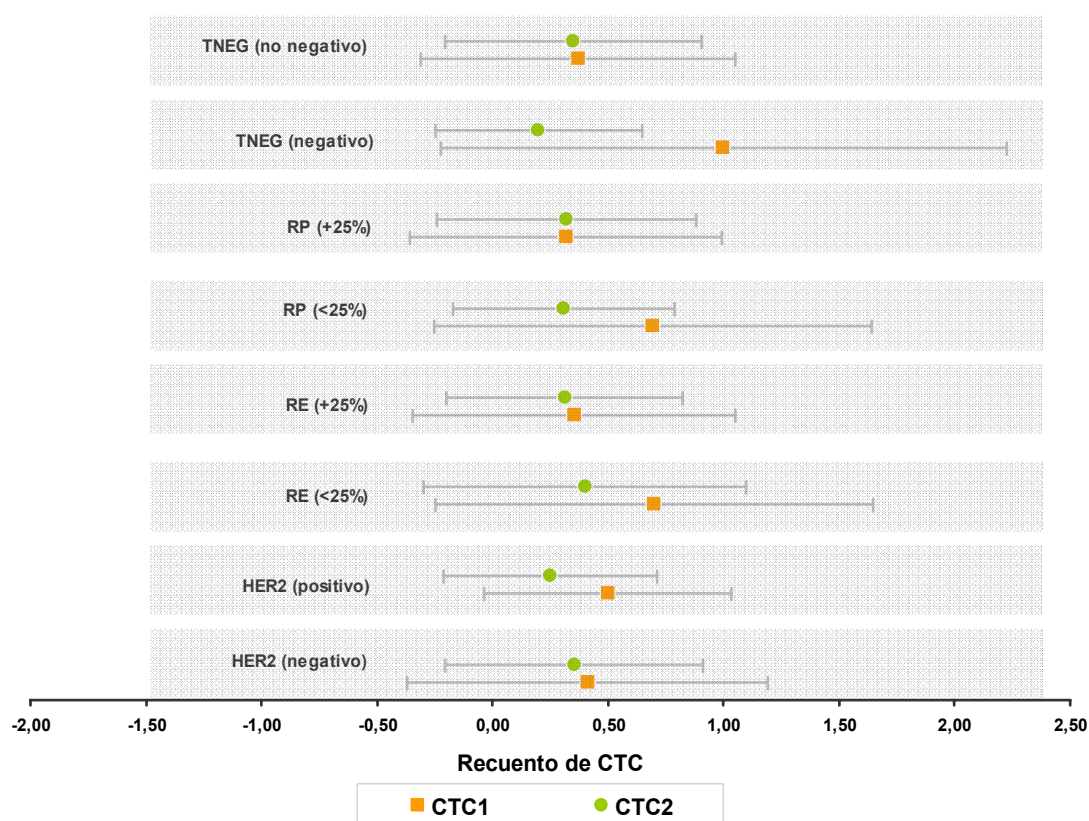


Figura 30. Relación entre CTC y hallazgos inmunohistoquímicos. Gráfico de medias y desviaciones estándar.

Los cuadrados naranjas son los valores medios de CTC1 para las variables marcadas en la figura (TNEG, RP, RE, HER2); Los círculos verdes son los valores medios de CTC2 para las variables marcadas en la figura (TNEG, RP, RE, HER2). Las marcas en gris son más/menos la desviación estándar. TNEG: triple negativo, RP: receptores de progesterona, RE: receptores estrogénicos.

Tabla 22. Detección de CTC prequirúrgicas (CTC1) en relación con las variables clínico-patológicas y factores pronósticos clásicos.

		CTC 1				p
		=0		1 - 4		
		N	%	N	%	
Edad (cuartiles)	<= 50	11	64,7%	6	35,3%	p=0,91
	51 - 57	9	75,0%	3	25,0%	
	58 - 66	11	73,3%	4	26,7%	
	>67	10	66,7%	5	33,3%	
Palpable	No	16	64,0%	9	36,0%	p=0,42
	Sí	25	73,5%	9	26,5%	
LOCALIZACIÓN (cuadrantes)	CIE	7	87,5%	1	12,5%	p=0,23
	CII	1	50,0%	1	50,0%	
	CSE	14	63,6%	8	36,4%	
	Varios	1	33,3%	2	66,7%	
	CSI	6	66,7%	3	33,3%	
	ICE	4	100,0%	0	,0%	
	ICS	7	87,5%	1	12,5%	
	Retroareolar	1	33,3%	2	66,7%	
Multifocalidad/ multicentricidad	No	34	75,6%	11	24,4%	p=0,098
	Sí	7	50,0%	7	50,0%	
NÚMERO DE CIRUGÍAS	Una cirugía	31	72,1%	12	27,9%	p=0,27
	Dos cirugías	10	66,7%	5	33,3%	
	Tres cirugías	0	,0%	1	100,0%	
USO DE ARPÓN	Sí	14	60,9%	9	39,1%	p=0,25
	No	27	75,0%	9	25,0%	
TIPO DE CIRUGÍA	Mastectomía	12	60,0%	8	40,0%	p=0,39
	Tumorectomía	28	73,7%	10	26,3%	
	Recambio prótesis	1	100,0%	0	,0%	
Estirpe tumoral	Ductal infiltrante	29	67,4%	14	32,6%	p=0,707
	Lobulillar	5	83,3%	1	16,7%	
	otros	7	70,0%	3	30,0%	
TNM (tipo)	T1	31	73,8%	11	26,2%	p=0,25
	T2	10	58,8%	7	41,2%	
	T3	0	,0%	0	,0%	
Tamaño Tumoral	T1mic	2	50,0%	2	50,0%	p=0,208
	T1a	5	83,3%	1	16,7%	
	T1b	4	50,0%	4	50,0%	
	T1c	20	83,3%	4	16,7%	
	T2	10	58,8%	7	41,2%	
GRADO ELSTON	G1	13	76,5%	4	23,5%	p=0,68
	G2	20	64,5%	11	35,5%	
	G3	7	70,0%	3	30,0%	
componente in situ	No	31	68,9%	14	31,1%	p=1
	Sí	10	71,4%	4	28,6%	

Tabla 23. Detección de CTC prequirúrgicas (CTC1) en relación con la técnica de ganglio centinela, linfadenectomía e inmunohistoquímica.

		CTC 1			
		=0		1 - 4	
		N	%	N	%
Número de Ganglios Centinela resecados	Un GC	15	68,2%	7	31,8%
	Dos GC	19	73,1%	7	26,9%
	Tres GC	2	50,0%	2	50,0%
	Cuatro GC	5	71,4%	2	28,6%
GANGLIO CENTINELA (%)	Positivo	5	50,0%	5	50,0%
	Negativo	36	73,5%	13	26,5%
Número de ganglios centinela positivos	Ninguno	36	73,5%	13	26,5%
	Uno	4	50,0%	4	50,0%
	Dos	0	,0%	1	100,0%
	Tres	0	,0%	0	,0%
	Cuatro	1	100,0%	0	,0%
Tamaño de MTS GC	≤2mm	36	73,5%	13	26,5%
	>2mm	5	50%	5	50%
linfadenectomía	No	33	73,3%	12	26,7%
	Sí	8	57,1%	6	42,9%
Receptores estrógeno	<25%	5	50,0%	5	50,0%
	≥25%	36	75,0%	12	25,0%
Receptores progesterona	< 25%	7	53,8%	6	46,2%
	≥25 %	34	77,3%	10	22,7%
HER2	Positivo (>75% o FISH+)	4	50%	4	50%
	Negativo	37	72,5%	14	27,5%
KI67	<25%	25	71,4%	10	28,6%
	≥25%	16	69,6%	7	30,4%

Tabla 24. Detección de CTC postquirúrgicas (CTC2) en relación con las variables clínico-patológicas y factores pronósticos clásicos.

		CTC 2				
		=0		1 - 4		p
		N	%	N	%	
Edad (cuartiles)	<= 50	11	64,7%	6	35,3%	p=0,91
	51 - 57	9	75,0%	3	25,0%	
	58 - 66	10	66,7%	5	33,3%	
	67+	11	73,3%	4	26,7%	
Palpable	No	19	76,0%	6	24,0%	p=0,35
	Sí	22	64,7%	12	35,3%	
LOCALIZACIÓN (cuadrantes)	CIE	5	71,4%	2	28,6%	p=0, 23
	CII	2	100,0%	0	,0%	
	CSE	15	68,2%	7	31,8%	
	Varios	1	33,3%	2	66,7%	
	CSI	4	44,4%	5	55,6%	
	ICE	3	75,0%	1	25,0%	
	ICS	7	87,5%	1	12,5%	
	Retroareolar	3	100,0%	0	,0%	
Multifocalidad/ multicentricidad	No	31	68,9%	14	31,1%	p=1
	Sí	10	71,4%	4	28,6%	
NÚMERO DE CIRUGÍAS	Una cirugía	30	69,8%	13	30,2%	p=0,67
	Dos cirugías	10	66,7%	5	33,3%	
	Tres cirugías	1	100,0%	0	,0%	
USO DE ARPÓN	Sí	16	69,6%	7	30,4%	p=0,99
	No	25	69,4%	11	30,6%	
TIPO DE CIRUGÍA	Mastectomía	13	65,0%	7	35,0%	p=0,23
	Tumorectomía	28	73,7%	10	26,3%	
	Recambio prótesis	0	,0%	1	100,0%	
Estirpe tumoral	Ductal infiltrante	27	62,8%	16	37,2%	p=0,32
	Adenoide quístico	1	100,0%	0	,0%	
	Lobulillar	4	66,7%	2	33,3%	
	Mucinoso	2	100,0%	0	,0%	
	Tubular	3	100,0%	0	,0%	
	Medular	2	100,0%	0	,0%	
	Ductolobulillar	1	100,0%	0	,0%	
	Tubulolobulillar	1	100,0%	0	,0%	
Estirpe tumoral(3)	Ductal infiltrante	27	62,8%	16	37,2%	p=0,017
	Lobulillar	4	66,7%	2	33,3%	
	otros	10	100,0%	0	0%	
TNM (tipo)	T1	28	66,7%	14	33,3%	p=0,45
	T2	13	76,5%	4	23,5%	
	T3	0	,0%	0	,0%	
Tamaño Tumoral	T1mic	3	75,0%	1	25,0%	p=0.94
	T1a	4	66,7%	2	33,3%	
	T1b	5	62,5%	3	37,5%	
	T1c	16	66,7%	8	33,3%	
	T2	13	76,5%	4	23,5%	
GRADO ELSTON	G1	13	76,5%	4	23,5%	p=0,15
	G2	19	61,3%	12	38,7%	
	G3	9	90,0%	1	10,0%	
componente in situ	No	32	71,1%	13	28,9%	p=0,74
	Sí	9	64,3%	5	35,7%	

Tabla 25. Detección de CTC postquirúrgicas (CTC2) en relación con la técnica de ganglio centinela, linfadenectomía, e inmunohistoquímica.

		CTC 2				p
		=0		1 - 4		
		N	%	N	%	
Número de Ganglios Centinela resecados	Un GC	14	63,6%	8	36,4%	p=0,30
	Dos GC	18	69,2%	8	30,8%	
	Tres GC	3	75,0%	1	25,0%	
	Cuatro GC	6	85,7%	1	14,3%	
GANGLIO CENTINELA (%)	Positivo	7	70,0%	3	30,0%	p=1
	Negativo	34	69,4%	15	30,6%	
Número de ganglios centinela positivos	Ninguno	34	69,4%	15	30,6%	p=0,91
	Uno	5	62,5%	3	37,5%	
	Dos	1	100,0%	0	,0%	
	Tres	0	,0%	0	,0%	
	Cuatro	1	100,0%	0	,0%	
Tamaño de Metástasis de ganglio centinela	≤2mm	35	71,4%	14	28,6%	p=0,47
	+2mm	6	60%	4	40%	
linfadenectomía	No	32	71,1%	13	28,9%	p=0,74
	Sí	9	64,3%	5	35,7%	
Receptores Estrógeno	<25%	7	70,0%	3	30,0%	p=1
	≥25%	34	70,8%	14	29,2%	
Receptores Progesterona	< 25%	9	69,2%	4	30,8%	p=1
	≥25 %	32	72,7%	12	27,3%	
HER2	Positivo	6	75%	2	25%	p=1
	Negativo	35	68%	16	31,4%	
KI67	<25%	25	71,4%	10	28,6%	p=1
	≥25%	16	69,6%	7	30,4%	

II.F. RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES CLÍNICAS DE LA MUESTRA Y LOS RESULTADOS DE CITOQUERATINA 19 Y MAMOGLOBINA EN EL GANGLIO CENTINELA

La relación entre las variables clínicas de la muestra y los resultados de citoqueratina y mamoglobina en el ganglio centinela se exponen en las Tabla 28 a 33.

La edad, existencia de sintomatología en el momento de diagnóstico (palpable), la existencia de multicentricidad, el tipo tumoral, el grado histológico y la localización del tumor presentaron una distribución similar en relación a la detección o no de MG y CK19 del ganglio centinela.

II.F.1 Tipo de cirugía

El 19% de las pacientes a las que se les realizó como tratamiento quirúrgico una mastectomía presentaron positividad para MG o CK19, a diferencia del 7,9% de pacientes que presentaron positividad para MG o CK19 tras cirugía conservadora con tumorectomía. Diferencia sin significación estadística.

II.F.2 Tamaño tumoral

Se objetiva un incremento de detección de MG o/y CK19 en pacientes con mayores tamaños tumorales, de tal manera que en los casos con T microinfiltrante o T1a no se encuentra en la muestra ninguna detección de CK19 ni MG, frente al 25%, 12,5% y 11%

de casos positivos para MG y/o CK19 en T1b, T1c y T2, respectivamente. Diferencia no estadísticamente significativa ($p=0,46$). *Figura 31*.

Estudiando la relación de tamaño tumoral con MG o CK19 por separado, esta distribución se mantiene aunque continúa sin ser significativa.

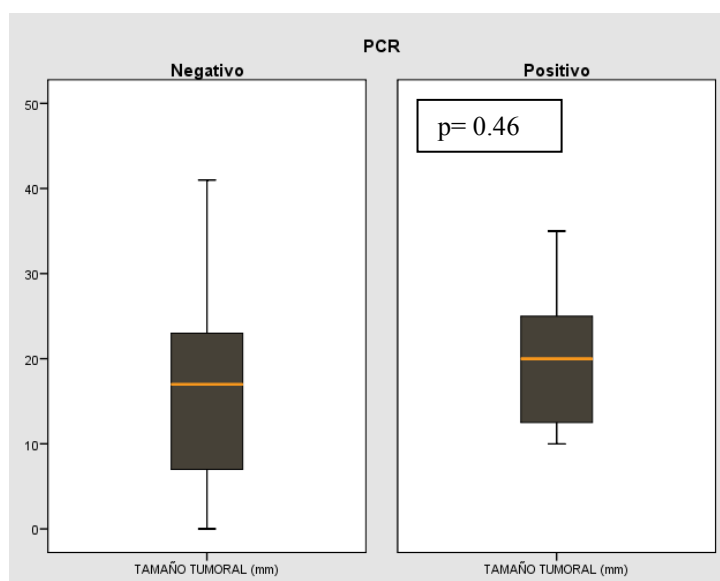


Figura 31. Relación entre estudio molecular de ganglio centinela (mamoglobina y citoqueratina 19) y tamaño tumoral.

II.F.3 Estirpe tumoral

El 14% de las pacientes con carcinoma ductal infiltrante y el 17% de aquellas con carcinoma lobulillar infiltrante, presentaron MG o CK19 positivas en el ganglio centinela. No se objetivó CK19 o MG positivas en ningún caso de carcinoma con otra estirpe tumoral.

Es decir, el 100% de las pacientes con CK19 o Mamoglobina positivos padecían carcinoma ductal o lobulillar infiltrante frente al 0% de otras estirpes tumorales. ($p=0,25$)

II.F.4 Componente in situ

Ninguna de las pacientes con componente de carcinoma ductal in situ en la anatomía patológica (14 pacientes) presentó detección positiva en MG o CK19. El porcentaje de MG o CK19 positiva en las pacientes sin carcinoma ductal in situ asociado es del 15%, diferencia sugerente que no alcanza la significación estadística ($p=0,184$)

II.G. RELACIÓN ENTRE EL RESULTADO DE LA BIOPSIA DE GANGLIO CENTINELA Y LA DETECCIÓN DE CITOKERATINA 19 Y MAMOGLOBINA

Existe una relación estadísticamente significativa entre estos dos parámetros:

El 96% de las pacientes con biopsia de ganglio centinela negativo para malignidad presentaron también negatividad en el análisis de ganglio centinela por PCR (48 de 50 pacientes). Se presentaron 2 casos (4%) en los que la BGC fue negativa y, sin embargo, presentaron positividad para metástasis en ganglio centinela por PCR (MG o CK19).

De entre las pacientes con hallazgo de metástasis en el ganglio centinela por análisis clásico (10 pacientes) tan solo 5 de ellas (50%) presentaron positividad por PCR. $p=0,001$. *Figura 32.*

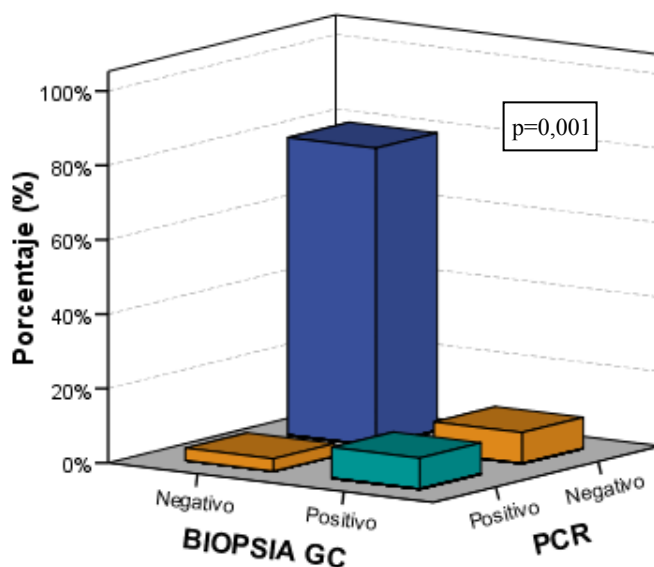


Figura 32. Relación entre resultados de BC por técnica anatomopatológica y por PCR. Diferencias estadísticamente significativas por el estudio.

Si se analiza de forma separada la relación entre BGC y los resultados de PCR de Mamoglobina, el 98% de los casos negativos por BGC son también negativos para Mamoglobina y 1 paciente (2%) presentó Mamoglobina positiva a pesar de BGC negativa; en el 50% de las pacientes con BGC positiva no se detectó MG por PCR del ganglio, diferencia también estadísticamente significativa, $p < 0,005$.

De igual manera, si se analiza de manera aislada la relación entre CK19 y BGC, el 98% de las pacientes con BGC negativo presentan también CK19 negativo; existe una paciente con detección de CK19 en PCR del ganglio a pesar de considerarse éste negativo en BGC, y sólo el 40% de los casos de BGC positivos presentan también CK19 positivo. ($p = 0,002$). *Figura 33.*

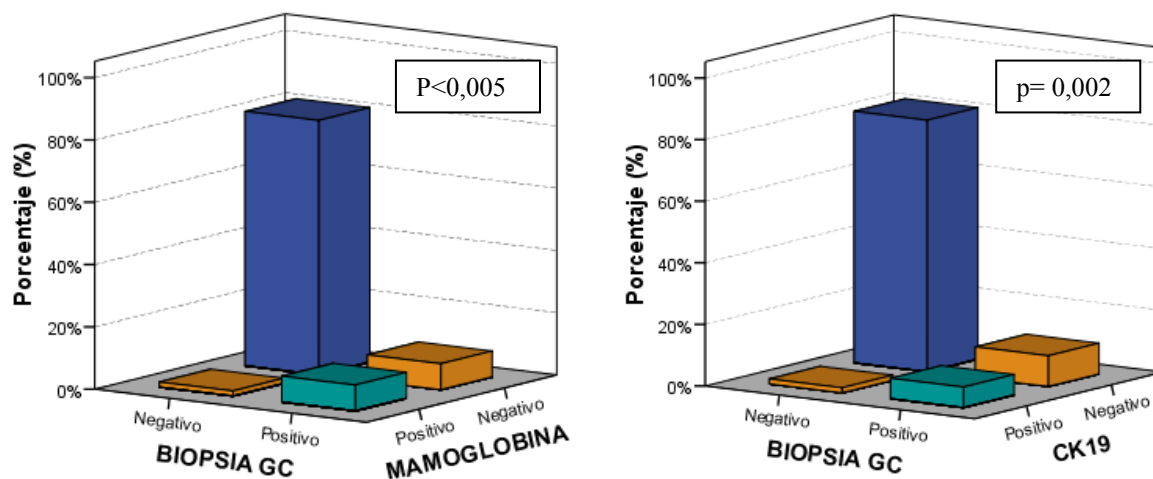


Figura 33. Relación entre resultados de biopsia de ganglio centinela y estudio molecular de mamoglobina y Citoqueratina19. Diferencias estadísticamente significativas por el estudio.

Si estudiamos la relación entre la detección de MG y CK19 con la biopsia de ganglio centinela teniendo en cuenta el tamaño de las metástasis ganglionares la relación es superponible: el 96% de las pacientes con BGC negativo o menor a 2mm no presentaron detección de CK19 ni MG. El 50% de los casos con metástasis mayor a 2mm en el ganglio centinela presentaron MG o CK19 positivo, diferencia estadísticamente significativa, $p=0,001$. *Figura 34.*

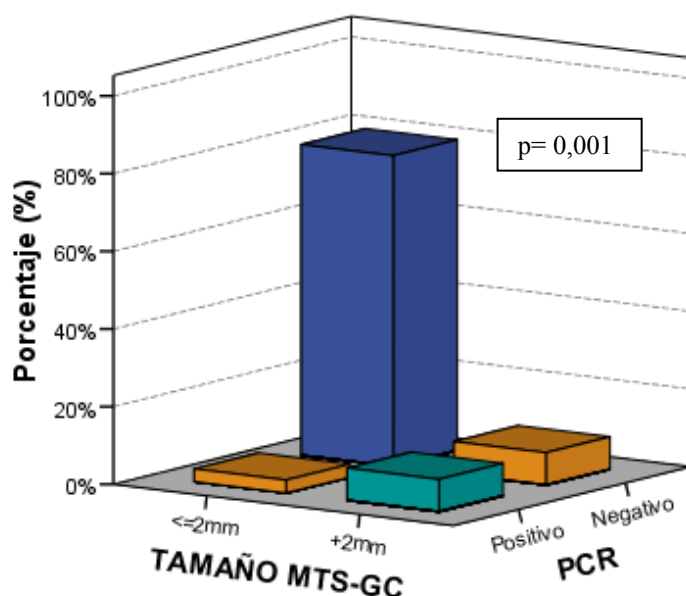


Figura 34. Relación entre resultados de biopsia de ganglio centinela (mayor de 2mm) y estudio molecular de mamoglobina y Citoqueratina19. Diferencias estadísticamente significativas por el estudio.

Por tanto, comparando la indicación de linfadenectomía realizada con la detección de MG y CK19: al 96% de las pacientes con CK19 y MG negativas no se les realizó linfadenectomía, sin embargo, 9 de las pacientes a las que se le realizó linfadenectomía (64%) presentaron MG y CK19 negativas y, por otro lado, a 2 de ellas (4,3%) no se les realizó linfadenectomía a pesar de detectar MG o CK19 positivo en el ganglio centinela, relación estadísticamente significativa, $p=0,006$. *Figura 35.*

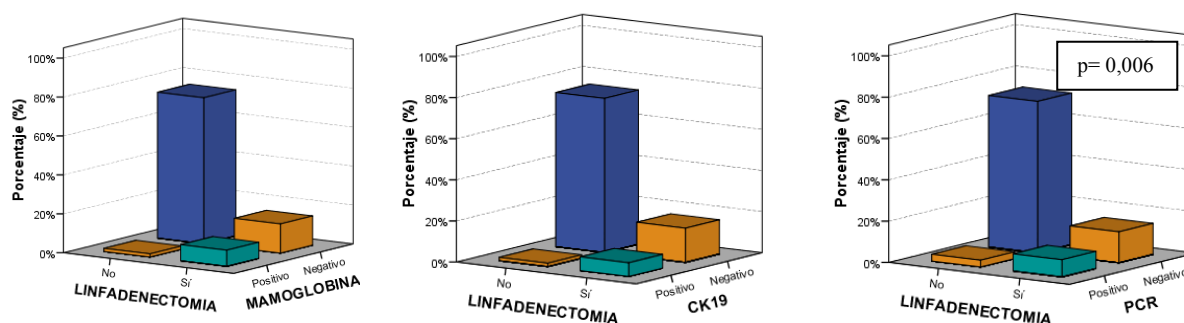


Figura 35. Relación entre realización o no de linfadenectomía y estudio molecular de Mamoglobina y Citoqueratina19.

II.G.1 Estudio de Sensibilidad y Especificidad del estudio molecular (Citoqueratina 19 y Mamoglobina) respecto al estudio histológico del Ganglio Centinela

Se ha realizado un estudio de especificidad y sensibilidad para valorar la utilidad del estudio molecular como método de análisis de ganglio centinela, considerando el estudio histológico del mismo el “patrón oro” o variable de referencia.

El estudio de especificidad consistió en construir una curva COR (*ROC curve*) mediante la cual se calculó los puntos de corte para las variables MG, CK19 y PCR con más alta sensibilidad y especificidad, determinado por la variable *gold standard* o variable de referencia: diagnóstico histológico del Ganglio Centinela. También se han indicado el área bajo la curva (AUC), su IC95% y el nivel de significación. Tabla 26. Posteriormente se estimó para las diferentes pruebas diagnósticas, según el punto de corte determinado

para cada variable: la sensibilidad, especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo. Tabla 27.

El análisis de CK19 por RT-PCR en ganglio centinela presenta una sensibilidad del 40% y una especificidad del 98%, el área bajo la curva ROC (AUC) es de 0,69. El análisis de Mamoglobina presento una sensibilidad de 50% y una especificidad del 98%, con un área bajo la curva ROC de 0,74, mejor que el de Citoqueratina19. Si se tiene en cuenta el análisis de ambos marcadores en conjunto se obtiene una sensibilidad de 50% y una especificidad del 96%, con un área bajo la curva ROC de 73% por lo que no mejora los datos obtenidos con un solo marcador. *Figura 36, 37 y 38.*

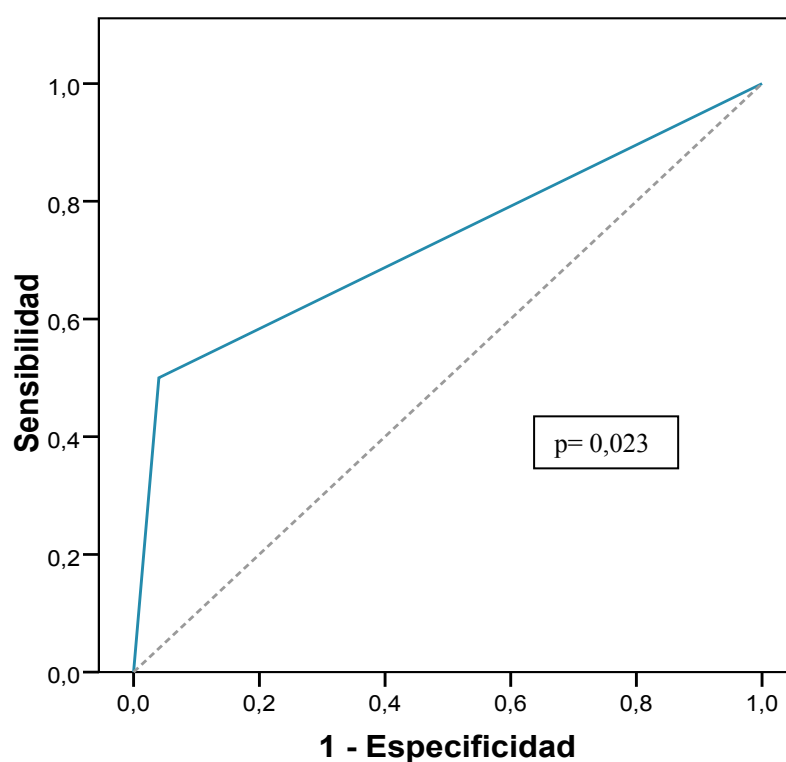
Tabla 26. *Área bajo la curva ROC. Estudio molecular respecto al estudio histológico de ganglio centinela.*

CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA COR: Área bajo la curva (AUC) e IC95%				
<i>Variables resultado de contraste</i>	AUC	IC95% inferior	IC95% superior	P
MG (cualitativa)	0,740	0,535	0,945	0,017
CK19 (cualitativa)	0,690	0,479	0,901	0,060
PCR (cualitativa)	0,730	0,526	0,934	0,023

Tabla 27. *Sensibilidad y especificidad del estudio molecular respecto al estudio histológico del ganglio centinela*

	Mamoglobina			Citoqueratina19			MG y CK19		
	Valor	IC (95%)		Valor	IC (95%)		Valor	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	50	14,01	85,99	40	4,64	75,36	50	14,01	85,99
Especificidad (%)	98	93,12	100	98	93,12	100	96	89,57	100
Índice de validez (%)	90	81,58	98,42	88,33	79,38	97,29	88,33	79,38	97,29
Valor predictivo + (%)	83,33	45,18	100	80	34,94	100	71,43	30,82	100
Valor predictivo - (%)	90,74	82,08	99,4	89,09	79,94	98,24	90,57	81,75	99,38
Prevalencia (%)	16,67	6,4	26,93	16,67	6,4	26,93	16,67	6,4	26,93
Índice de Youden	0,48	0,17	0,79	0,38	0,07	0,69	0,46	0,15	0,77
Razón de verosimilitud +	25	3,26	191,6	20	2,49	160,6	12,5	2,81	55,61
Razón de verosimilitud -	0,51	0,27	0,95	0,61	0,37	1,02	0,52	0,28	0,97

Curva COR



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Figura 36. *Curva COR para Mamoglobina y Citoqueratina respecto al estudio histológico de ganglio centinela.*

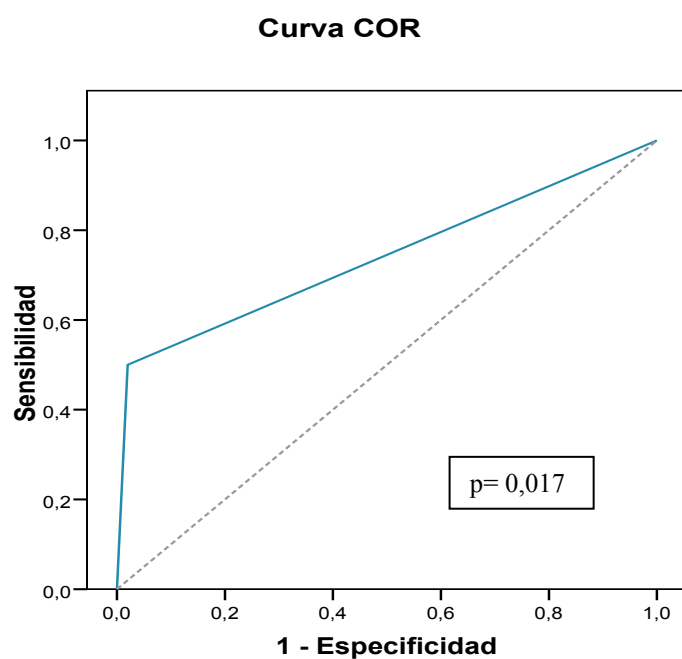


Figura 37. Curva COR para Mamoglobina respecto al estudio histológico de ganglio centinela.

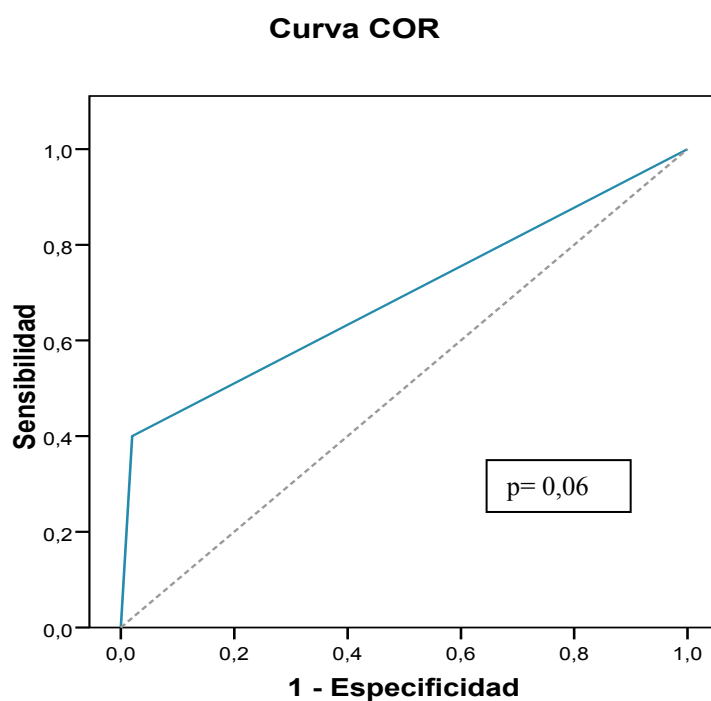


Figura 38. Curva COR para Citoqueratina19 respecto al estudio histológico de ganglio centinela.

II.H. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA DETECCIÓN DE CITOKERATINA19 Y MAMOGLOBINA Y LA INMUNOHISTOQUÍMICA DEL CARCINOMA DE MAMA

Todos los casos con detección de MG o CK19 en el ganglio centinela presentaron expresión de receptores estrogénicos ($RE \geq 25\%$). Es decir, no se detectó MG ni CK19 en el ganglio centinela de ninguna paciente con un cáncer negativo para receptores estrogénicos. De las pacientes con expresión de RE, en el 14% ($n=7$) se detectó MG o CK19 en el ganglio centinela y en el 86% no. ($p=0,2$).

En relación a los receptores de progesterona, la detección de MG y CK19 presentó una distribución similar en los casos con receptores de progesterona negativos o $<25\%$ (14%, $n=2$) y en los casos con receptores de progesterona positivos (11%, $n=5$).

Ninguna de las pacientes con detección de MG o CK19 en el ganglio centinela presentó HER2 positivo. De las pacientes con HER2 negativo, el 13,5% ($n=7$) presentó MG o K19 positivo en ganglio centinela y el 86,5% negativo.

Ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa. *Figura 39,40 y 41.*
Tabla 29.

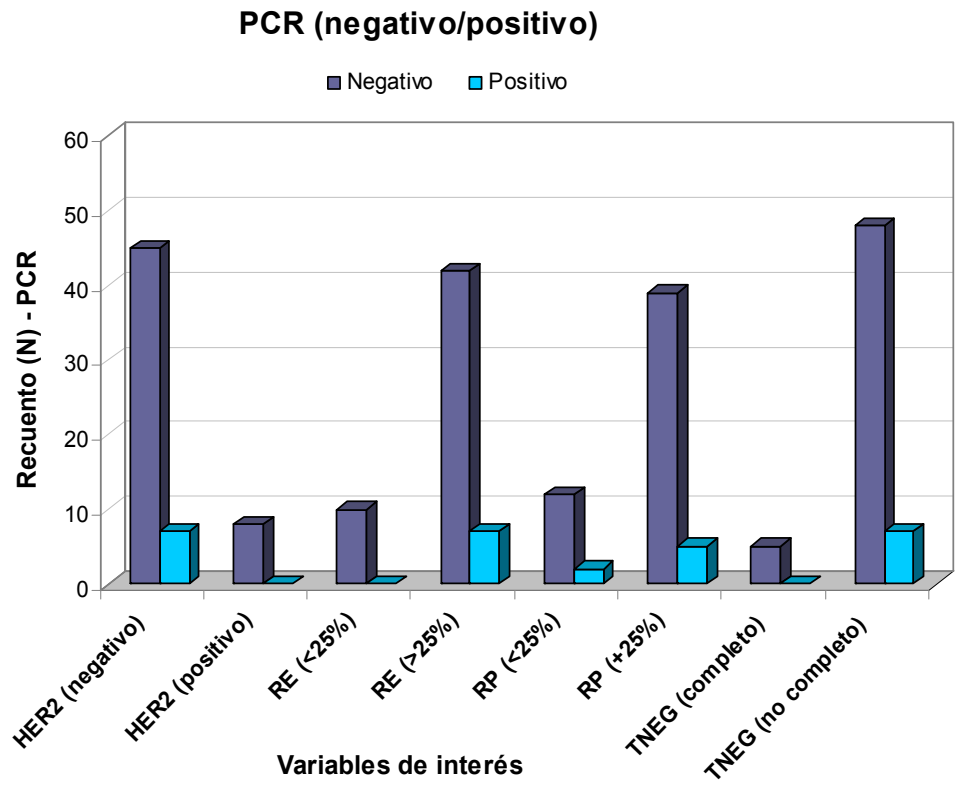


Figura 39. Relación entre resultados del estudio molecular de mamoglobina y Citoqueratina 19 con los hallagos inmunohistoquímicos.

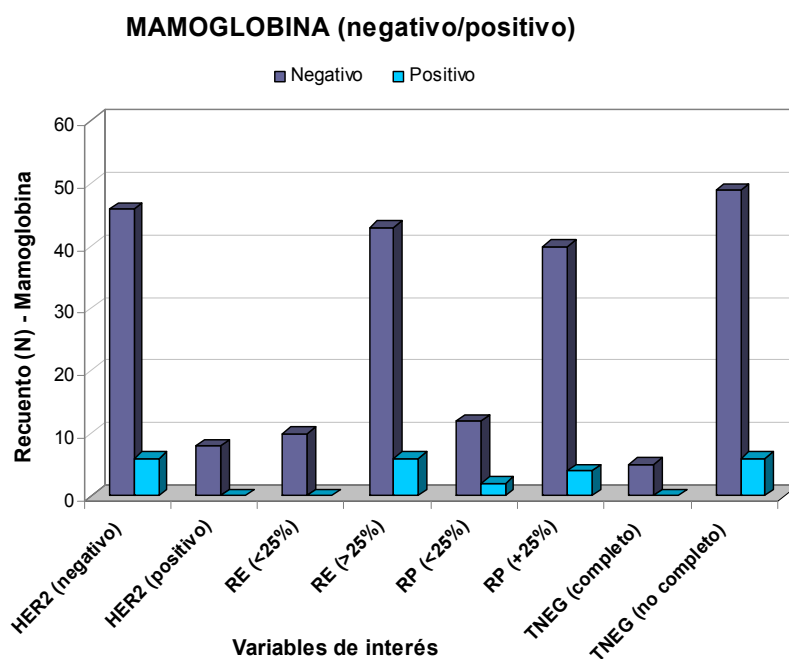


Figura 40. Relación entre resultados del estudio molecular de mamoglobina con los hallazgos inmunohistoquímicos.

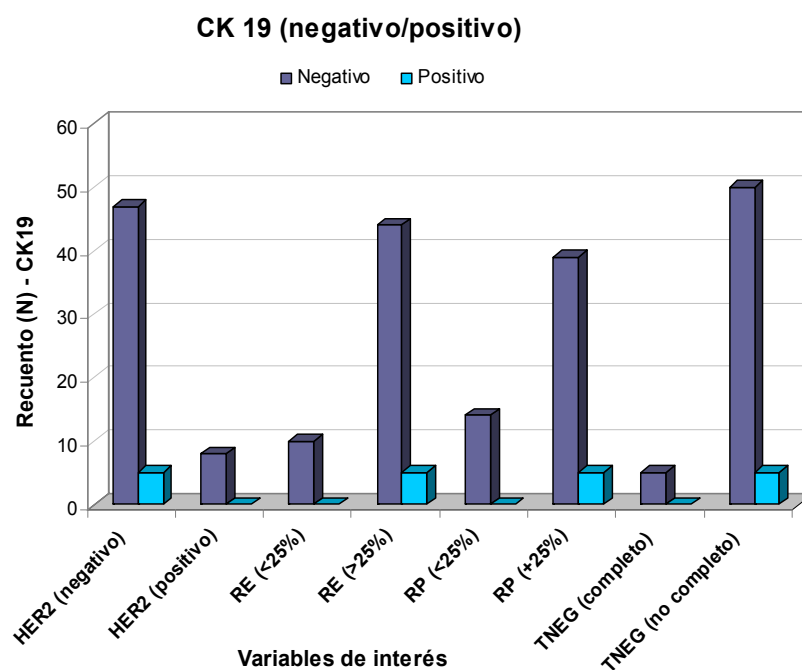


Figura 41. Relación entre resultados del estudio molecular Citoqueratina19 con los hallazgos inmunohistoquímicos.

Tabla 28. Resultado de CK19 por PCR en ganglio centinela en relación con las variables clínico-patológicas y factores pronósticos clásicos.

		CK19				p
		Positivo		Negativo		
		N	%	N	%	
Edad (cuartiles)	≤ 50	2	11,8%	15	88,2%	p=0,39
	51 - 57	0	,0%	13	100,0%	
	58 - 66	2	13,3%	13	86,7%	
	>67	1	6,7%	14	93,3%	
Palpable	No	1	4,0%	24	96,0%	p=0,39
	Sí	4	11,4%	31	88,6%	
LOCALIZACIÓN (cuadrantes)	CIE	1	14,3%	6	85,7%	p=0,83
	CII	0	,0%	2	100,0%	
	CSE	1	4,3%	22	95,7%	
	Varios	0	,0%	3	100,0%	
	CSI	1	11,1%	8	88,9%	
	ICE	1	25,0%	3	75,0%	
	ICS	1	12,5%	7	87,5%	
	Retroareolar	0	,0%	3	100,0%	
Multifocalidad/ multicentricidad	No	4	8,9%	41	91,1%	p=1
	Sí	1	6,7%	14	93,3%	
NÚMERO DE CIRUGÍAS	Una cirugía	4	9,1%	40	90,9%	p=0,87
	Dos cirugías	1	6,7%	14	93,3%	
	Tres cirugías	0	,0%	1	100,0%	
USO DE ARPÓN	Sí	1	4,2%	23	95,8%	p=0,64
	No	4	11,1%	32	88,9%	
TIPO DE CIRUGÍA	Mastectomía	2	9,5%	19	90,5%	p=0,89
	Tumorectomía	3	7,9%	35	92,1%	
	Recambio prótesis	0	,0%	1	100,0%	
Estirpe tumoral	Ductal infiltrante	4	9,1%	40	90,9%	p=0,94
	Adenoide quístico	0	,0%	1	100,0%	
	Lobulillar	1	16,7%	5	83,3%	
	Mucinoso	0	,0%	2	100,0%	
	Tubular	0	,0%	3	100,0%	
	Medular	0	,0%	2	100,0%	
	Ductolobulillar	0	,0%	1	100,0%	
	Tubulolobulillar	0	,0%	1	100,0%	
Estirpe tumoral (3)	Ductal	4	9,1%	40	90,9%	p=0,33
	Lobilillar	1	16,7%	5	83,3%	
	Otros	0	0%	10	100%	
TNM (tipo)	T1	5	11,9%	37	88,1%	p=0,3
	T2	0	,0%	18	100,0%	
	T3	0	,0%	0	,0%	
Tamaño Tumoral	T1mic	0	,0%	4	100,0%	p=0,11
	T1a	0	,0%	6	100,0%	
	T1b	2	25,0%	6	75,0%	
	T1c	3	12,5%	21	87,5%	
	T2	0	,0%	18	100,0%	
GRADO ELSTON	G1	1	5,9%	16	94,1%	p=0,89
	G2	3	9,4%	29	90,6%	
	G3	1	10,0%	9	90,0%	
componente in situ	No	5	10,9%	41	89,1%	p=0,33
	Sí	0	,0%	14	100,0%	

Tabla 29. Resultado de CK19 por PCR en ganglio centinela en relación con la técnica de ganglio centinela, linfadenectomía, e inmunohistoquímica.

		CK19					
		Positivo		Negativo		p	
		N	%	N	%		
Número de GC	Un GC	3	13,6%	19	86,4%	p=0,184	
	Dos GC	2	7,4%	25	92,6%		
	Tres GC	0	,0%	4	100,0%		
	Cuatro GC	0	,0%	7	100,0%		
GANGLIO CENTINELA (%)	Positivo	4	40,0%	6	60,0%	p=0,002	
	Negativo	1	2,0%	49	98,0%		
Número de GC positivos	Ninguno	1	2,0%	49	98,0%	p<0,001	
	Uno	4	50,0%	4	50,0%		
	Dos	0	,0%	1	100,0%		
	Tres	0	,0%	0	,0%		
	Cuatro	0	,0%	1	100,0%		
Tamaño de MTS GC	≤2mm	1	2,0%	49	98,0%	p=0,002	
	>2mm	4	40,0%	6	60,0%		
linfadenectomía	No	1	2,2%	45	97,8%	p=0,009	
	Si	4	28,6%	10	71,4%		
RE	<25%	0	,0%	10	100,0%	p=0,57	
	≥25%	5	10,2%	44	89,8%		
RP	< 25%	0	,0%	14	100,0%	p=0,32	
	≥25 %	5	11,4%	39	88,6%		
HER2	Positivo	0	0%	8	100%	p=1	
	Negativo	5	9,6	47	90,4%		
KI67	<25%	4	11,1%	32	88,9%	p=0,66	
	≥25%	1	4,3%	22	95,7%		

Tabla 30. Resultado de Mamoglobina por PCR en ganglio centinela en relación con las variables clínico-patológicas y factores pronósticos clásicos.

		Mamoglobina				p
		Positivo		Negativo		
		N	%	N	%	
Edad (cuartiles)	≤50	2	11,8%	15	88,2%	p=0,91
	51 - 57	1	7,7%	12	92,3%	
	58 - 66	2	13,3%	13	86,7%	
	>67	1	6,7%	14	93,3%	
Palpable	No	1	4,0%	24	96,0%	p=0,39
	Sí	5	14,3%	30	85,7%	
LOCALIZACIÓN (cuadrantes)	CIE	0	,0%	7	100,0%	p=0,39
	CII	0	,0%	2	100,0%	
	CSE	2	8,7%	21	91,3%	
	Varios	0	,0%	3	100,0%	
	CSI	1	11,1%	8	88,9%	
	ICE	2	50,0%	2	50,0%	
	ICS	1	12,5%	7	87,5%	
	Retroareolar	0	,0%	3	100,0%	
Multifocalidad/ multicentricidad	No	4	8,9%	41	91,1%	p=0,63
	Sí	2	13,3%	13	86,7%	
NÚMERO DE CIRUGÍAS	Una cirugía	6	13,6%	38	86,4%	p=0,14
	Dos cirugías	0	,0%	15	100,0%	
	Tres cirugías	0	,0%	1	100,0%	
USO DE ARPÓN	Sí	2	8,3%	22	91,7%	p=1
	No	4	11,1%	32	88,9%	
TIPO DE CIRUGÍA	Mastectomía	4	19,0%	17	81,0%	p=0,24
	Tumorectomía	2	5,3%	36	94,7%	
	Recambio prótesis	0	,0%	1	100,0%	
Estirpe tumoral	Ductal infiltrante	5	11,4%	39	88,6%	p=0,93
	Adenoide quístico	0	,0%	1	100,0%	
	Lobulillar	1	16,7%	5	83,3%	
	Mucinoso	0	,0%	2	100,0%	
	Tubular	0	,0%	3	100,0%	
	Medular	0	,0%	2	100,0%	
	Ductolobulillar	0	,0%	1	100,0%	
	Tubulolobulillar	0	,0%	1	100,0%	
Estirpe tumoral (3)	Ductal infiltrante	5	1,4%	39	88,6%	p=0,29
	Lobulillar	1	16,7%	5	83,3%	
	Otros	0	0%	10	100%	
TNM (tipo)	T1	4	9,5%	38	90,5%	p=1
	T2	2	11,1%	16	88,9%	
	T3	0	,0%	0	,0%	
Tamaño Tumoral	T1mic	0	,0%	4	100,0%	p=0,67
	T1a	0	,0%	6	100,0%	
	T1b	1	12,5%	7	87,5%	
	T1c	3	12,5%	21	87,5%	
	T2	2	11,1%	16	88,9%	
GRADO ELSTON	G1	1	5,9%	16	94,1%	p=0,75
	G2	4	12,5%	28	87,5%	
	G3	1	10,0%	9	90,0%	
componente in situ	No	6	13,0%	40	87,0%	p=0,32
	Sí	0	0%	14	100,0%	

Tabla 31. Resultado de Mamoglobina por PCR en ganglio centinela en relación con la técnica de ganglio centinela, linfadenectomía, e inmunohistoquímica.

		Mamoglobina				p
		Positivo		Negativo		
		N	%	N	%	
Numero de GC	Un GC	2	9,1%	20	90,9%	p=0,22
	Dos GC	4	14,8%	23	85,2%	
	Tres GC	0	,0%	4	100,0%	
	Cuatro GC	0	,0%	7	100,0%	
GANGLIO CENTINELA (%)	Positivo	5	50,0%	5	50,0%	p<0,001
	Negativo	1	2,0%	49	98,0%	
Número GC positivos	Ninguno	1	2,0%	49	98,0%	p<0,001
	Uno	5	62,5%	3	37,5%	
	Dos	0	,0%	1	100,0%	
	Tres	0	,0%	0	,0%	
	Cuatro	0	,0%	1	100,0%	
Tamaño de MTS GC	≤2mm	1	2,0%	49	98,0%	p<0,001
	>2mm	5	50%%	5	50%	
linfadenectomía	No	1	2,2%	45	97,8%	p=0,002
	Sí	5	35,7%	9	64,3%	
RE	<25%	0	,0%	10	100,0%	p=0,57
	≥25%	6	12,2%	43	87,8%	
RP	< 25%	2	14,3%	12	85,7%	p=0,62
	≥25 %	4	9,1%	40	90,9%	
HER2	Positivo	0	0%	8	100%	p=0,58
	Negativo	6	1,5%	46	88,5%	
KI67 (<25%)	<25%	4	11,1%	32	88,9%	p=1
	≥25%	2	8,7%	21	91,3%	

Tabla 32. Resultado de Mamoglobina y Citoqueratina 19 por PCR en ganglio centinela en relación con las variables clínico-patológicas y factores pronósticos clásicos.

		PCR				
		Positivo		Negativo		p
		N	%	N	%	
Edad (cuartiles)	≤ 50	2	11,8%	15	88,2%	p=0,68
	51 - 57	1	7,7%	12	92,3%	
	58 - 66	3	20,0%	12	80,0%	
	>67	1	6,7%	14	93,3%	
Palpable	No	1	4,0%	24	96,0%	p=0,22
	Sí	6	17,1%	29	82,9%	
LOCALIZACIÓN (cuadrantes)	CIE	1	14,3%	6	85,7%	p=0,56
	CII	0	,0%	2	100,0%	
	CSE	2	8,7%	21	91,3%	
	Varios	0	,0%	3	100,0%	
	CSI	1	11,1%	8	88,9%	
	ICE	2	50,0%	2	50,0%	
	ICS	1	12,5%	7	87,5%	
	Retroareolar	0	,0%	3	100,0%	
Multifocalidad/ multicentricidad	No	5	11,1%	40	88,9%	p=1
	Sí	2	13,3%	13	86,7%	
NÚMERO DE CIRUGÍAS	Una cirugía	6	13,6%	38	86,4%	p=0,66
	Dos cirugías	1	6,7%	14	93,3%	
	Tres cirugías	0	,0%	1	100,0%	
USO DE ARPÓN	Sí	2	8,3%	22	91,7%	p=0,69
	No	5	13,9%	31	86,1%	
TIPO DE CIRUGÍA	Mastectomía	4	19,0%	17	81,0%	p=0,41
	Tumorectomía	3	7,9%	35	92,1%	
	Recambio prótesis	0	,0%	1	100,0%	
Estirpe tumoral	Ductal infiltrante	6	13,6%	38	86,4%	p=0,9
	Adenoide quístico	0	,0%	1	100,0%	
	Lobulillar	1	16,7%	5	83,3%	
	Mucinoso	0	,0%	2	100,0%	
	Tubular	0	,0%	3	100,0%	
	Medular	0	,0%	2	100,0%	
	Ductolobulillar	0	,0%	1	100,0%	
	Tubulolobulillar	0	,0%	1	100,0%	
Estirpe tumoral (3)	Ductal	6	13,6	38	8,4%	p=0,25
	Lobilillar	1	16,7%	5	83,3%	
	otros	0	0%	10	100%	
TNM (tipo)	T1	5	11,9%	37	88,1%	p=1
	T2	2	11,1%	16	88,9%	
	T3	0	,0%	0	,0%	
Tamaño Tumoral	T1mic	0	,0%	4	100,0%	p=0,46
	T1a	0	,0%	6	100,0%	
	T1b	2	25,0%	6	75,0%	
	T1c	3	12,5%	21	87,5%	
	T2	2	11,1%	16	88,9%	
GRADO ELSTON	G1	1	5,9%	16	94,1%	p=0,56
	G2	5	15,6%	27	84,4%	
	G3	1	10,0%	9	90,0%	
Componente in situ	No	7	15,%	39	84,8%	p=0,18
	Sí	0	,0%	14	100,0%	

Tabla 33. Resultado de Mamoglobina y Citoqueratina 19 por PCR en ganglio centinela en relación con la técnica de ganglio centinela, linfadenectomía e inmunohistoquímica.

		PCR				p
		Positivo		Negativo		
		N	%	N	%	
Número de GC	Un GC	3	13,6%	19	86,4%	p=0,18
	Dos GC	4	14,8%	23	85,2%	
	Tres GC	0	,0%	4	100,0%	
	Cuatro GC	0	,0%	7	100,0%	
GANGLIO CENTINELA (%)	Positivo	5	50,0%	5	50,0%	p=0,001
	Negativo	2	4,0%	48	96,0%	
Número de GC positivos	Ninguno	2	4,0%	48	96,0%	p<0,001
	Uno	5	62,5%	3	37,5%	
	Dos	0	,0%	1	100,0%	
	Tres	0	,0%	0	,0%	
	Cuatro	0	,0%	1	100,0%	
Tamaño de MTS GC	≤2mm	2	4,0%	48	96,0%	p=0,001
	>2mm	5	50%	5	50%	
linfadenectomía	No	2	4,3%	44	95,7%	p=0,006
	Sí	5	35,7%	9	64,3%	
RE	<25%	0	,0%	10	100,0%	p=0,2
	≥25%	7	14,3%	42	85,7%	
RP	< 25%	2	14,3%	12	85,7%	p=0,77
	≥25 %	5	11,4%	39	88,6%	
HER2	Positivo	0	0%	8	100%	p=0,57
	Negativo	7	13,5%	45	86,5%	
KI67 (<25%)	<25%	5	13,9%	31	86,1%	p=0,69
	>25%	2	8,7%	21	91,3%	

II.1. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE CTC1 Y CTC2

Se comparan los resultados del análisis de células circulantes en muestras de sangre extraídas antes y después de la cirugía de cáncer de mama (CTC1 y CTC2 respectivamente). *Figura 42. Tabla 34.*

Tanto en el análisis prequirúrgico como en el postquirúrgico, se obtuvo un resultado de $CTC \geq 1$ del 30% y $CTC = 0$ del 69%, datos concordantes.

En el 27% de las pacientes sin detección prequirúrgica de CTC ($CTC1 = 0$) se positivizó el hallazgo de CTC en el análisis postquirúrgico ($CTC2 \geq 1$). El restante 73% de las pacientes sin CTC prequirúrgico ($CTC1 = 0$) permaneció con este parámetro negativo en la detección postquirúrgica ($CTC2 = 0$).

Sin embargo, de las pacientes con detección prequirúrgica de CTC ($CTC1 \geq 1$, $n=18$), sólo el 39% presentó CTC en la detección postquirúrgica ($CTC2 \geq 1$, $n=7$) mientras en el restante 61% no se detectaron células circulantes en la detección postquirúrgica a pesar de que se habían hallado previamente. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Si comparamos los casos que presentaron cifras de CTC iguales o mayores a 2 en las determinaciones prequirúrgica y postquirúrgica, ninguna paciente presentó 2 o más CTC en ambas detecciones. De las pacientes con $CTC1$ menor a 2, el 3,7% presentó $CTC2$ igual o mayor a 2.

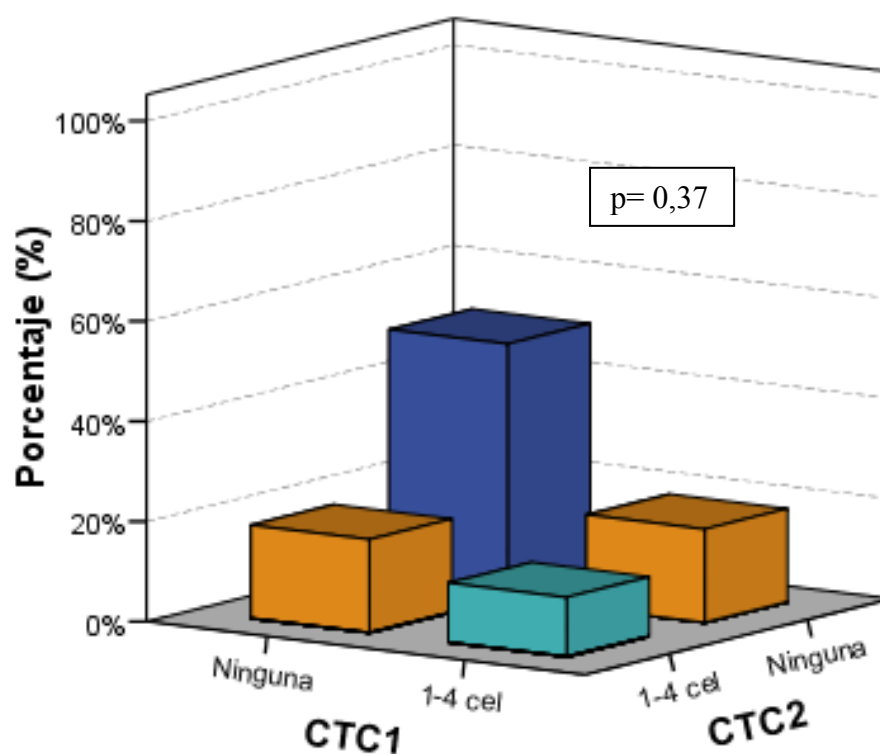


Figura 42. Relación entre Células Tumorales Circulantes prequirúrgicas (CTC1) y postquirúrgicas (CTC2).

Tabla 34. Resultado de la relación entre CTC pre y postquirúrgicas

		CTC 2				
		=0 CTC2		≥1 CTC2		p
		N	%	N	%	
CTC 1	=0 CTC1	30	73,2%	11	26,8%	p=0,37
	≥1 CTC1	11	61,1%	7	38,9%	
		<2 CTC2		≥2 CTC2		p
		N	%	N	%	
	<2 CTC1	52	96,3%	2	3,7%	p=0,54
	≥2 CTC1	5	100%	0	0%	

II.I.1 Influencia de la cirugía en la diseminación celular

Para averiguar si la cirugía podía ser causa de modificación de los niveles de CTC, se compararon las mediciones de CTC1 (pre-cirugía) y CTC2 (post-cirugía) mediante dos pruebas no paramétricas para medidas repetidas ya que se comprobó que no seguían una distribución normal. Estas pruebas fueron: el *test exacto de Wilcoxon* y el *test exacto de homogeneidad marginal*. El nivel de significación en la comparación se fijó en $\alpha=0,05$ bilateral.

Mediante la prueba exacta de Wilcoxon así como mediante la prueba exacta de homogeneidad marginal se determina que no se detectan diferencias estadísticamente significativas entre CTC1 frente a CTC2, por tanto, se puede concluir que no hay evidencia de que la cirugía modifique los niveles de CTC.

- Prueba exacta de Wilcoxon:

Resultados de la prueba de Wilcoxon: nivel de significación bilateral exacto $p=0,584$.

- Prueba exacta de homogeneidad marginal:

Resultados de la prueba de homogeneidad marginal: nivel de significación bilateral exacto $p=0,583$.

II.J. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA DETECCIÓN DE MAMOGLOBINA Y CITOQUERATINA19 EN GANGLIO CENTINELA Y DE CTC

Existe una distribución semejante en referencia al estudio molecular de CK19 y MG entre las pacientes con o sin detección de CTC. Tabla 37.

La detección de mamoglobina fue negativa en el 93% de pacientes con CTC1 negativa y en el 89% de pacientes con detección positiva de CTC1. De manera superponible, la detección de mamoglobina fue negativa en el 93% de las pacientes con CTC2 negativa y en el 89% de las pacientes con CTC2 positiva. Relaciones todas ellas no estadísticamente significativas.

Igualmente, la CK19 del ganglio centinela fue negativa en el 93% de las pacientes en las que no se detectaron CTC1 y en el 89% de las pacientes con detección de CTC1. De la misma manera, la CK19 fue negativa en el 90% de las pacientes sin detección de CTC2 y en el 94% de las pacientes con detección de CTC2.

Esta distribución semejante de CTC se mantiene al compararla con los resultados de MG y CK juntos. Tabla 37.

Tabla 35. Resultado de la relación entre CTC y Mamoglobina

		Mamoglobina				
		Positivo		Negativo		p
		N	%	N	%	
CTC 1	=0	3	7,3%	38	92,7%	p=0,63
	≥1	2	11,1%	16	88,9%	
CTC 2	=0	3	7,3%	38	92,7%	p=0,63
	≥1	2	11,1%	16	88,9%	

Tabla 36. Resultado de la relación entre CTC y Citoqueratina 19

		CK19				
		Positivo		Negativo		p
		N	%	N	%	
CTC1	=0	3	7,3%	38	92,7%	p=0,45
	≥1	2	11,1%	16	88,9%	
CTC 2	=0	4	9,8%	37	90,2%	Pp=0,51
	≥1	1	5,6%	17	94,4%	

Tabla 37. Resultado de la relación entre CTC y Mamoglobina y Citoqueratina 19

		CK19 y Mamoglobina				p
		Positivo		Negativo		
		N	%	N	%	
CTC1	=0	4	9,8%	37	90,2%	p=0,87
	≥1	2	11,1%	16	88,9%	
CTC 2	=0	4	9,8%	37	90,2%	p=0,87
	≥1	2	11,1%	16	88,9%	

II.K. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE MAMOGLOBINA Y CITOQUERATINA 19

En 7 de las 60 pacientes estudiadas (11,7%) se detectó Mamoglobina y/o Citoqueratina19 positiva en el fragmento estudiado del ganglio centinela, en concreto, en 4 casos (6,7% del total) fueron detectadas ambas moléculas, en 2 casos (3,3%) fue positivo únicamente para Mamoglobina y en un caso (1,7%) únicamente para Citoqueratina 19. El 88,3% de las pacientes presentaron resultados negativos para ambos parámetros. *Figura 43. Tabla 38.*

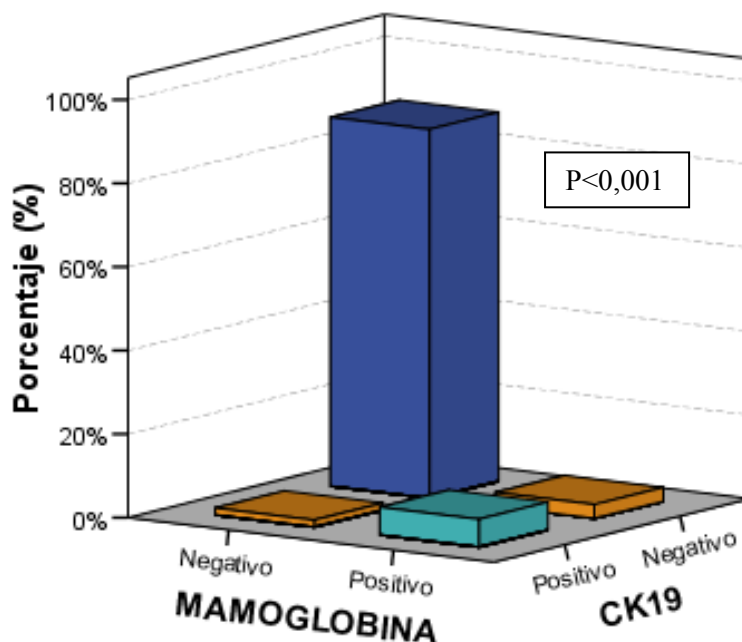


Figura 43. Relación entre resultados de mamoglobina y Citoqueratin19. Diferencias estadísticamente significativas por el estudio.

Tabla 38. *Resultado de la relación Mamoglobina y citoqueratina 19.*

		Mamoglobina				
		Positivo		Negativo		p
		N	%	N	%	
CK19	Positivo	4	6,7%	1	1,7%	p<0,001
	Negativo	2	3,3%	53	88,3%	

III. ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA

III.A. TIEMPOS DE SUPERVIVENCIA

El tiempo mediano de seguimiento fue de 35 meses (31 – 38 meses) y el tiempo máximo de seguimiento para SG y SLE fue de 56 meses. El tiempo mediano de supervivencia en las 60 pacientes fue de 18 meses (4 – 45 meses) con tres fallecimientos contabilizados por cáncer de mama al finalizar el estudio. El tiempo mediano de supervivencia libre de enfermedad entre las pacientes de la base de datos fue 4 meses (3– 40 meses) con tres recidivas, una *recidiva loco-regional* y dos *metástasis a distancia* hasta la finalización del seguimiento. Tabla 39.

Tabla 39. Tiempos de seguimiento, supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad.

	MEDIANA	PERCENTIL 25	PERCENTIL 75	N
Tiempo seguimiento (meses)	35,5	31,0	38,0	60
Tiempo de supervivencia (meses)	18,0	4,0	45,0	3
Tiempo de libre de enfermedad (meses)	4,0	3,0	40,0	3

III.B. RELACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL Y LIBRE DE ENFERMEDAD CON LAS VARIABLES ESTUDIADAS

Se ha estudiado la relación de las variables clínico patológicas, poblacionales, los factores pronósticos, el estudio de ganglio centinela de manera clásica y mediante RT-PCR y los resultados de CTC con la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global.

En nuestra muestra, no se encuentra relación estadísticamente significativa entre el riesgo de recidiva local, a distancia, ni supervivencia total con los factores pronósticos clásicos como tamaño tumoral, grado histológico ni estadio ganglionar.

Tampoco se encuentra relación entre las características de las pacientes o el tipo de tratamiento quirúrgico y la supervivencia. (*Anexo 1: tabla de variables no significativas*)

III.B.1 Supervivencia Global

La supervivencia global acumulada a los 6 meses de seguimiento se estimó en un 98,3% (IC95%: 88,8-99,8%) con un 59 pacientes a riesgo para el siguiente periodo, siempre para una población con las mismas características que esta muestra. A 48 meses de seguimiento, el porcentaje de supervivencia acumulada de la muestra fue de 84,6% (44,0-96,6%) con 57 pacientes a riesgo hasta finalizar el estudio, contabilizándose tres eventos después de 56 meses de seguimiento. Tabla 41.

Para Supervivencia global, las variables *recidiva loco-regional*, *metástasis a distancia (mts-distancia)*, *triple negativo*, *Receptores estrogénicos negativo*, *CTC1* y *CTC1 \geq 2* fueron significativos. Tabla 40.

Tabla 40. Comparación de las curvas de supervivencia para supervivencia global.

VARIABLES	Test Log-Rank	Test Breslow
<i>Recidiva loco-regional</i>	< 0,001	< 0,001
<i>Metástasis-distancia</i>	< 0,001	< 0,001
<i>RE (<25% / +25%)</i>	0,036	0,134
<i>Triple negativo</i>	0,023	0,022
<i>CTC1 (<2CTC / \geq2CTC)</i>	0,036	0,038
<i>CTC1 (Ninguna / Al menos una)</i>	0,079	0,033

* Niveles de significación. Nivel de referencia para ambos tests $p < 0,05$

La supervivencia global acumulada a los 36 meses de seguimiento se estimó en un 100% para el grupo con CTC1 =0 frente al 94,4% (IC95%: 66,6-99,2%) del grupo CTC1 \geq 1 célula, para una población con las mismas características que esta muestra. *Figura 44.*

En este tiempo de seguimiento, la supervivencia global acumulada se estimó de 98,2% (IC95%: 87,6-99,7%) para el grupo con CTC1 <2 células frente al 80% (IC95%:20,4-96,9%) en las pacientes con CTC1 \geq 2 células. *Figura 45.*

Con respecto a las características inmunohistoquímicas, la supervivencia global acumulada a los 36 meses de seguimiento se estimó en un 90% (IC95%: 47,3-98,5%) para el grupo de receptores hormonales negativos (RE<25%) frente al 98% (IC95%: 86,4-99,7%) del grupo con receptores hormonales positivos, para una población con las mismas características que esta muestra. *Figura 46.*

Del mismo modo, tras un seguimiento de 36 meses, la supervivencia global acumulada se estimó de 80% (IC95%: 20,4-96,6%) para el grupo con carcinoma subtipo triple negativo frente al 98% (IC95%: 87,8-99,7%) en las pacientes con cualquier otro subtipo inmunohistoquímico. *Figura 47.*

La supervivencia global presentó relación significativa con la aparición de recidiva loco-regional y metástasis a distancia durante el seguimiento de las pacientes. *Figura 48.*
Figura 49.

En las Tablas 41 y 42 se especifica la supervivencia global a los 6, 12, 36 y 48 meses en relación a cada una de las variables significativas y las variables no significativas más importantes.

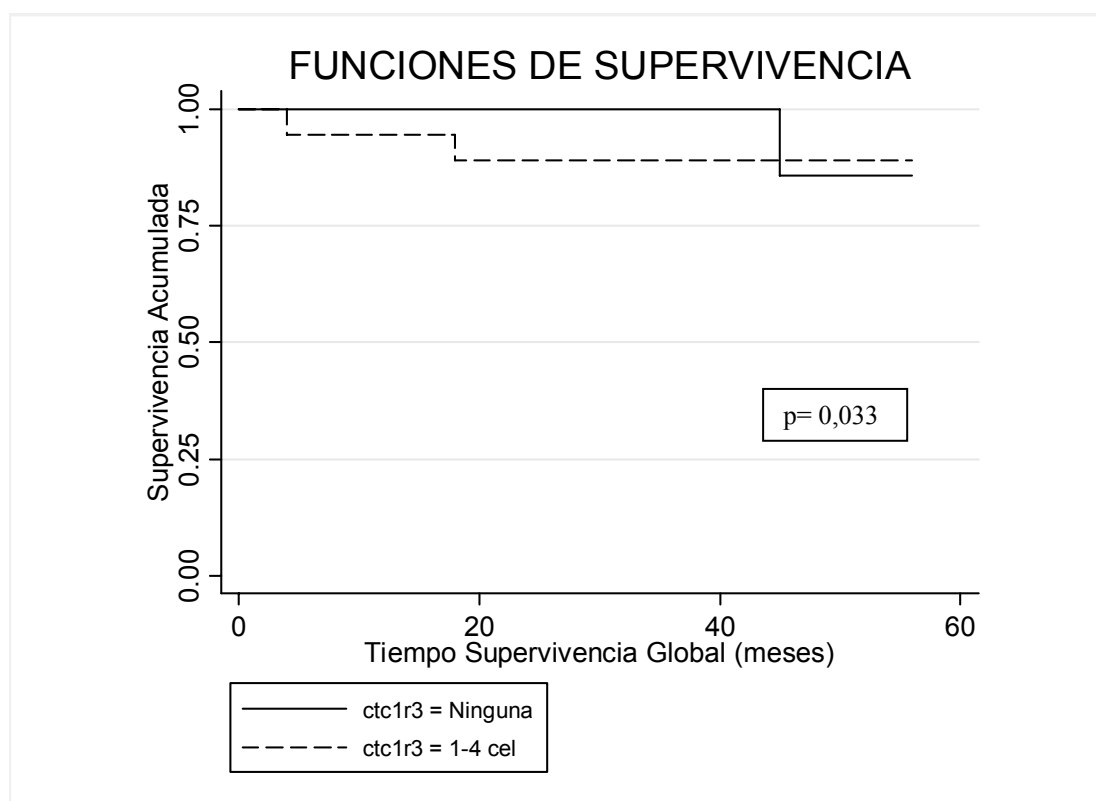


Figura 44. Función de supervivencia: Relación entre supervivencia global y presencia de CTC prequirúrgicas.

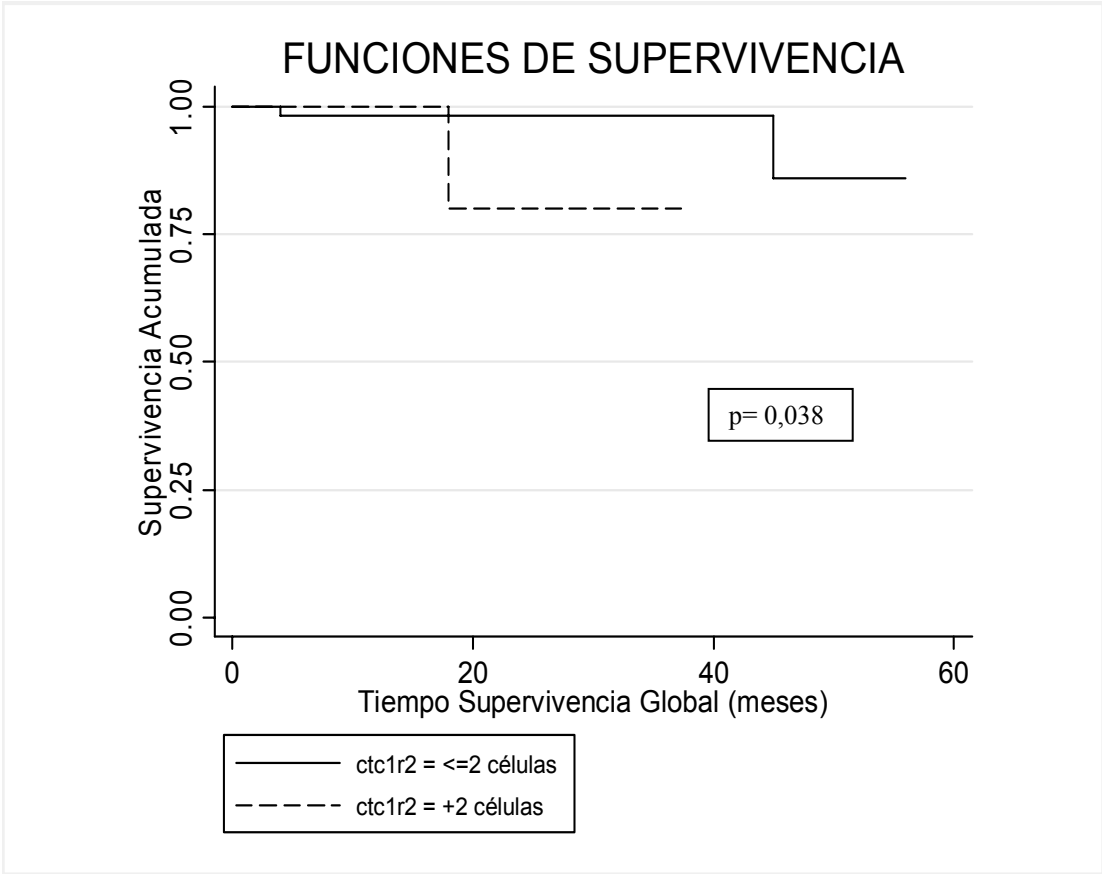


Figura 45. Función de supervivencia: Relación entre supervivencia global y presencia de 2 o más CTC prequirúrgicas.

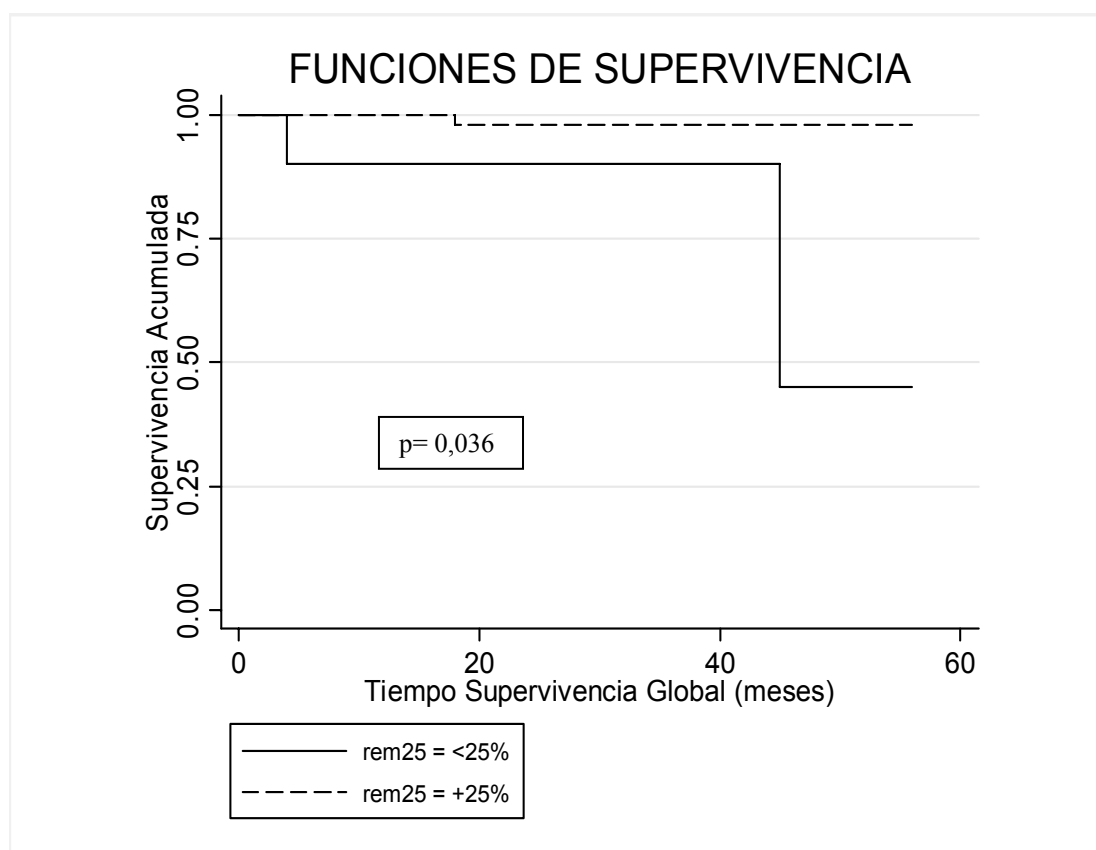


Figura 46. Función de supervivencia: Relación entre supervivencia global y receptores de estrogénos.

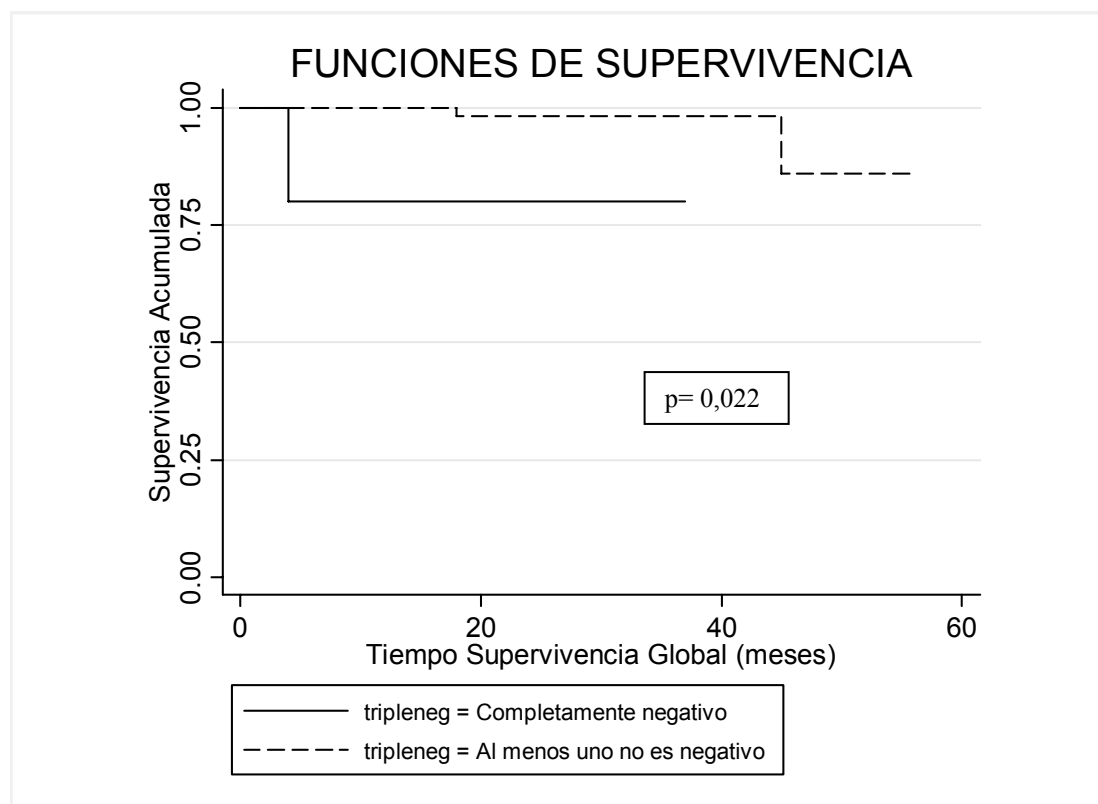


Figura 47. Función de supervivencia: Relación entre supervivencia global y fenotipo tumoral triple negativo.

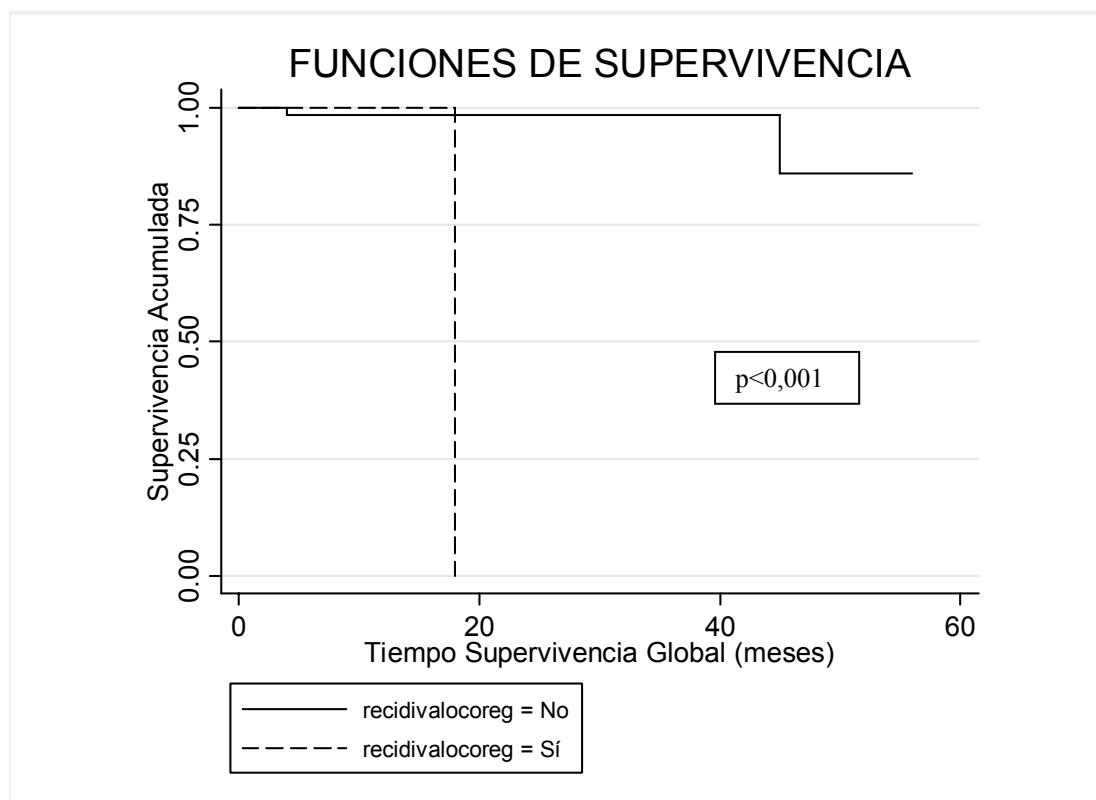


Figura 48. Función de supervivencia: Relación entre supervivencia global y recidiva loco regional.

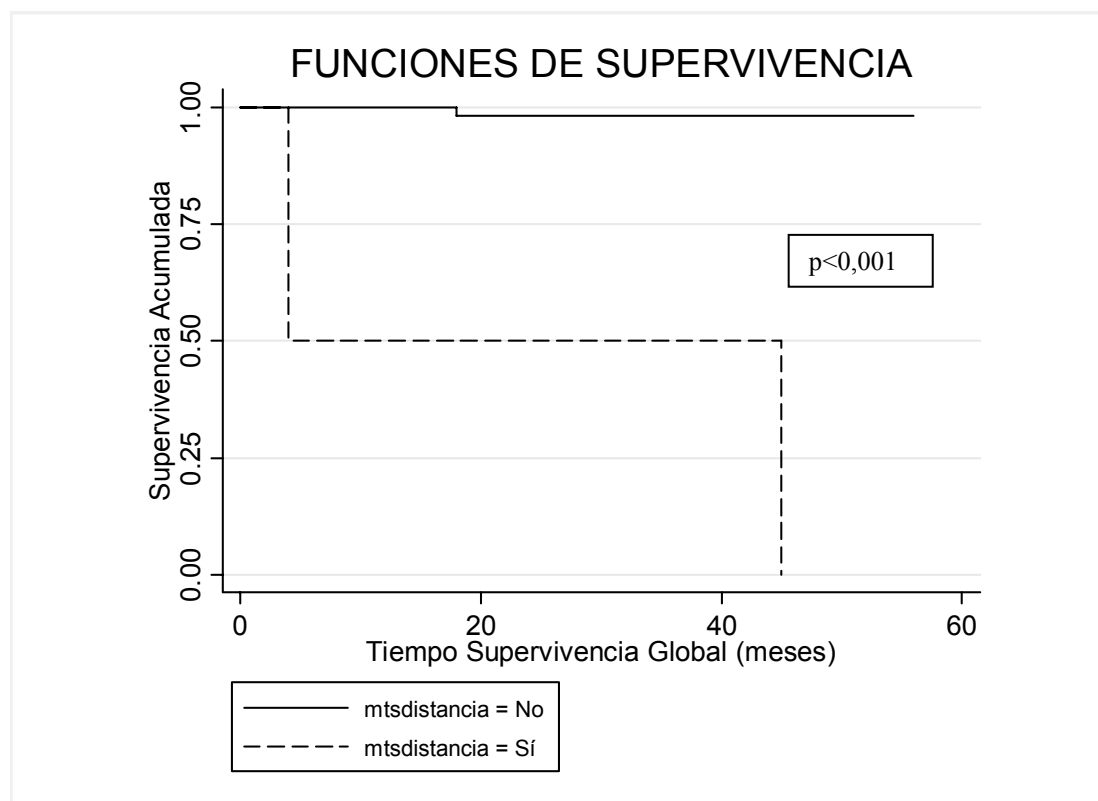


Figura 49. Función de supervivencia: Relación entre supervivencia global y metástasis a distancia.

Tabla 41. Supervivencia Global. Análisis de la supervivencia en meses a los 6,12,36 y 48 meses.

	6				12 m				36 m				48 m			
	%	IC95% INF	IC95% SUP	n	%	IC95% INF	IC95% SUP	n	%	IC95% INF	IC95% SUP	n	%	IC95% INF	IC95% SUP	n
SUPERVIVENCIA GLOBAL (N=60)	98,3	88,8	99,8	59	98,3	88,8	99,8	59	96,7	87,3	99,2	58	84,6	44,0	96,6	57
VARIABLES	6 m				12 m				36 m				48 m			
	%	IC95% INF	IC95% SUP	n	%	IC95% INF	IC95% SUP	n	%	IC95% INF	IC95% SUP	n	%	IC95% INF	IC95% SUP	n
CTC1																
<=2células (n=54)	98,2	87,6	99,7	53	98,2	87,6	99,7	53	98,2	87,6	99,7	53	85,9	42,1	97,4	52
+2células (n=5)	100,0	0,0	0,0	5	100,0	0,0	0,0	5	80,0	20,4	96,9	4	80,0	20,4	96,9	4
CTC2																
<=2células (n=57)	98,3	88,2	99,8	56	98,3	88,2	99,8	56	96,5	86,7	99,1	55	96,5	86,7	99,1	55
+2células (n=2)	100,0	0,0	0,0	2	100,0	0,0	0,0	2	100,0	0,0	0,0	2	0,0	0,0	0,0	1
CTC1																
0 células (n=41)	100,0	0,0	0,0	41	100,0	0,0	0,0	41	100,0	0,0	0,0	41	85,7	33,4	97,9	40
1 - 4 células (n=18)	94,4	66,6	99,2	17	94,4	66,6	99,2	17	94,4	66,6	99,2	17	88,9	62,4	97,1	16
CTC2																
0 células (n=41)	100,0	0,0	0,0	41	100,0	0,0	0,0	41	97,6	83,9	99,7	40	97,6	83,9	99,7	40
1 - 4 células (n=18)	94,4	66,6	99,2	17	94,4	66,6	99,2	17	94,4	66,6	99,2	17	70,8	15,9	93,7	16
CTC (Suma 1+2)																
Ninguna célula (n=30)	100,0	0,0	0,0	30	100,0	0,0	0,0	30	100,0	0,0	0,0	30	100,0	0,0	0,0	30
Al menos una (n=29)	96,6	78,0	99,5	28	96,6	78,0	99,5	28	93,1	75,1	98,2	27	74,5	25,8	93,8	26
GC (p/n)																
Negativo (n=50)	98,0	86,6	99,7	49	98,0	96,6	99,7	49	96,0	84,9	99,0	48	82,3	38,9	96,1	48
Positivo (n=10)	100,0	0,0	0,0	10	100,0	0,0	0,0	10	100,0	0,0	0,0	10	100,0	0,0	0,0	10

%. Porcentaje de supervivencia; n: número de pacientes en riesgo; IC95%: intervalo de confianza del 95% para el porcentaje de supervivencia.

Tabla 42. Supervivencia Global. Análisis de la supervivencia en meses a los 6,12,36 y 48 meses(continuación).

VARIABLES	6 m				12 m				36 m				48 m			
	%	IC95% INF	IC95% SUP	n	%	IC95% INF	IC95% SUP	n	%	IC95% INF	IC95% SUP	n	%	IC95% INF	IC95% SUP	n
MG																
Negativo (n=54)	98,2	87,6	99,7	53	98,2	87,6	99,7	53	96,3	86,0	99,1	52	84,3	44,3	96,5	51
Positivo (n=6)	100,0	0,0	0,0	6	100,0	0,0	0,0	6	100,0	0,0	0,0	6	100,0	0,0	0,0	6
CK19																
Negativo (n=55)	98,2	87,8	99,7	54	98,2	87,8	99,7	54	96,4	86,2	99,1	53	82,6	38,6	96,2	52
Positivo (n=5)	100,0	0,0	0,0	5	100,0	0,0	0,0	5	100,0	0,0	0,0	5	100,0	0,0	0,0	5
PCR																
Negativo (n=53)	98,1	87,4	99,7	52	98,1	87,4	99,7	52	96,2	85,7	99,0	51	82,5	38,7	96,2	50
Positivo (n=7)	100,0	0,0	0,0	7	100,0	0,0	0,0	7	100,0	0,0	0,0	7	100,0	0,0	0,0	7
RECIDIVA LOCOREGIONAL																
No (n=59)	98,3	88,6	99,8	58	98,3	88,6	99,8	58	98,3	88,6	99,8	58	86,0	41,9	97,4	57
Si (n=1)	100,0	0,0	0,0	1,0	100,0	0,0	0,0	1	0,0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0,0	0
MTS DISTANCIA																
No (n=58)	100,0	0,0	0,0	58	100,0	0,0	0,0	58	98,3	88,4	99,8	57	98,3	88,4	99,8	57
Si (n=2)	50,0	0,6	91,0	1	50,0	0,6	91,0	1	50,0	0,6	91,0	1	0,0	0,0	0,0	0
ECOGRAFIA																
No (n=6)	100,0	0,0	0,0	6	100,0	0,0	0,0	6	83,3	27,3	97,5	5	83,3	27,3	97,5	5
Si (n=54)	98,2	87,6	99,7	53	98,2	87,6	99,7	53	98,2	87,6	99,7	53	85,9	42,1	97,4	52
RE (<25%/+25%)																
< 25% (n=10)	90,0	47,3	98,5	9	90,0	47,3	98,5	9	90,0	47,3	98,5	9	45,0	1,0	87,1	8
+ 25% (n=49)	100,0	0,0	0,0	49	100,0	0,0	0,0	49	98,0	86,4	99,7	48	98,0	86,4	99,7	48
RP (<25%/+25%)																
< 25% (n=14)	92,9	59,1	99,0	13	92,9	59,1	99,0	13	92,9	59,1	99,0	13	92,9	59,1	99,0	13
+ 25% (n=44)	100,0	0,0	0,0	44	100,0	0,0	0,0	44	97,7	84,9	99,7	43	83,8	70,0	96,9	42
TRIPLE NEGATIVO																
Completamente negativo (n=5)	80,0	20,4	96,6	4	80,0	20,4	96,6	4	80,0	20,4	96,6	4	80,0	20,4	96,6	4
Al menos uno no es negativo (n=55)	100,0	0,0	0,0	55	100,0	0,0	0,0	55	98,2	87,8	99,7	54	85,9	42,1	97,4	53

%: Porcentaje de supervivencia; n: número de pacientes en riesgo; IC95%: intervalo de confianza del 95% para el porcentaje de supervivencia.

III.B.2 Supervivencia Libre de Enfermedad

La supervivencia libre de enfermedad acumulada a los 6 meses de seguimiento se estimó en un 96,7% (IC95%: 87,3-99,2%) con un 58 pacientes a riesgo para el siguiente periodo, siempre para una población con las mismas características que esta muestra. A 48 meses de seguimiento, el porcentaje de supervivencia libre de enfermedad acumulada de la muestra fue de 88,6% (59,3-97,2%) con 57 pacientes a riesgo hasta finalizar el estudio, contabilizándose tres eventos después de 56 meses de seguimiento. Tabla 44.

Las variables cuyas curvas de supervivencia difirieron entre sí significativamente fueron: *recidiva loco-regional*, *metástasis a distancia*, *subtipo triple negativo*, *receptores estrogénicos negativo*, *CTC1*, *CTC1 \geq 2* y *CTC2 \geq 2*. Tabla 43.

Tabla 43. Comparación de las curvas de supervivencia para supervivencia libre de enfermedad.

VARIABLES	Test Log-Rank	Test Breslow
Recidiva loco-regional (Sí / No)	< 0,001	< 0,001
Mts-distancia (Sí / No)	< 0,001	< 0,001
RE (<25% / +25%)	0,022	0,127
Triple negativo	0,034	0,036
CTC1 (<2c / +2c)	0,025	0,023
CTC2 (<2c / +2c)	0,025	0,649
CTC1 (Ninguna / Al menos una)	0,079	0,033

* Niveles de significación. Nivel de referencia para ambos tests $p < 0,05$

La supervivencia libre de enfermedad acumulada a los 36 meses de seguimiento se estimó en un 100% para el grupo con CTC1 =0 frente al 88,9% (IC95%: 62,4-97,1%) del grupo CTC1 ≥ 1 célula, para una población con las mismas características que esta muestra.

Figura 50.

En este tiempo de seguimiento, la supervivencia libre de enfermedad acumulada se estimó de 98,2% (IC95%: 87,6-99,7%) para el grupo con CTC1 <2 células frente al 80% (IC95%: 20,4-96,9%) en las pacientes con CTC1 ≥ 2 células. *Figura 51.*

En las Tabla 44 y 45 se especifica la supervivencia libre de enfermedad a los 6, 12, 36 y 48 meses en relación a cada una de las variables significativas y con las variables no significativas más importantes. La supervivencia libre de enfermedad acumulada a los 6 meses de seguimiento se estimó en un 98,2% (IC95%: 87,6-99,7%) para el grupo con CTC1 (<2 células) con 53 personas a riesgo para el siguiente periodo frente al 80% (20,4-96,9%) del grupo CTC1 (≥ 2 células) con 4 personas a riesgo, para una población con las mismas características que esta muestra. A 48 meses de seguimiento, el porcentaje de supervivencia libre de enfermedad acumulada para CTC1 (<2 células) fue de 90,0% (57,7-98,0%) con 52 pacientes a riesgo hasta finalizar el estudio frente al grupo CTC1 (≥ 2 células) cuyo porcentaje de supervivencia libre de enfermedad acumulada fue de 80,0% (20,4%-96,9%) con 4 personas a riesgo, contabilizándose tres recidivas después de 56 meses de seguimiento.

En referencia a las CTC postquirúrgicas, la supervivencia libre de enfermedad acumulada a los 36 meses se estimó de 96,5% (IC95%: 86,7-99,1) en las pacientes con

CTC2 < 2 y del 100% en las pacientes con CTC mayor o igual a 2, sin embargo, si se tiene en cuenta el final del seguimiento, a los 48 meses, supervivencia libre de enfermedad para las pacientes con CTC2<2 permanece estable pero para las pacientes con CTC ≥ 2 baja al 0%. *Figura 52.*

Con respecto a las características inmunohistoquímicas, la supervivencia libre de enfermedad acumulada a los 36 meses de seguimiento se estimó en un 90% (IC95%: 47,3-98,5%) para el grupo de receptores estrogénicos negativos (RE<25%) frente al 98% (IC95%: 86,4-99,7%) del grupo con receptores estrogénicos positivos, para una población con las mismas características que esta muestra. *Figura 53.*

Del mismo modo, tras un seguimiento de 36 meses, la supervivencia libre de enfermedad acumulada se estimó de 80% (IC95%: 20,4-96,6%) para el grupo con carcinoma subtipo triple negativo frente al 98% (IC95%: 87,8-99,7%) en las pacientes con cualquier otro subtipo inmunohistoquímico. *Figura 54.*

La supervivencia libre de enfermedad presentó relación significativa con la aparición de recidiva loco-regional y metástasis a distancia durante el seguimiento de las pacientes. *Figuras 55 y 56.*

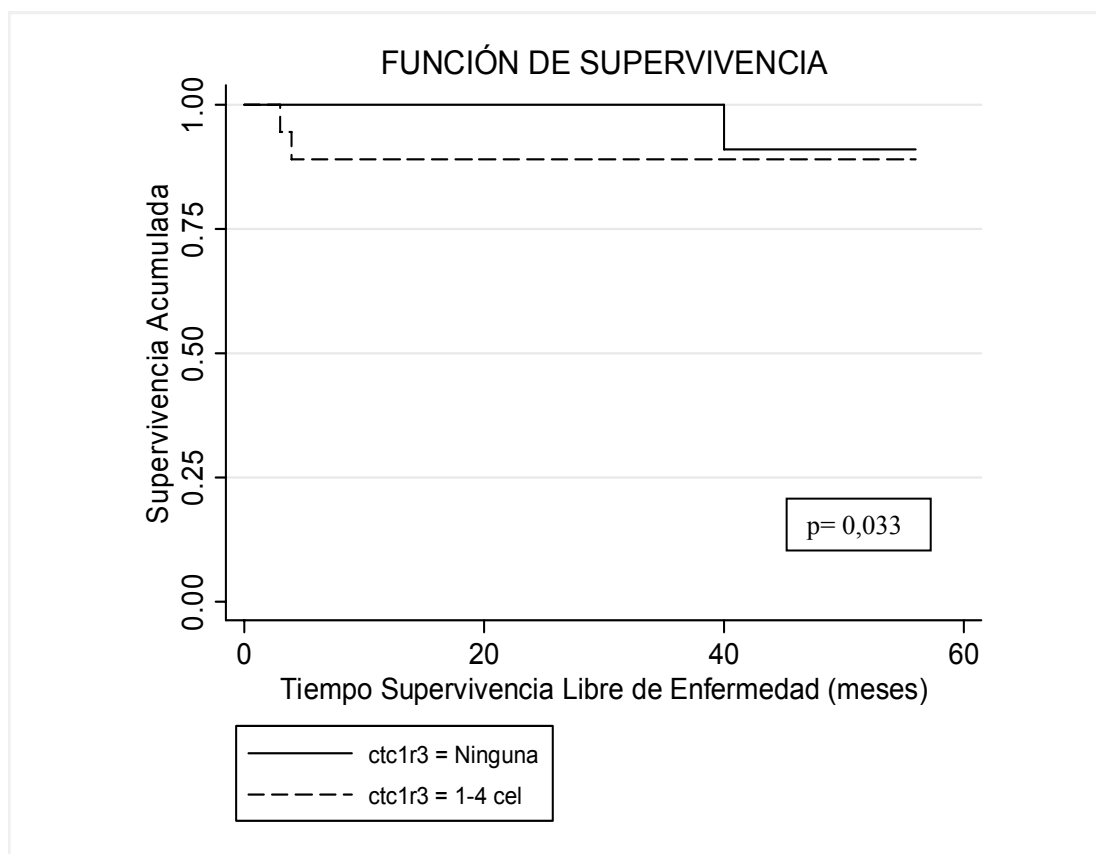


Figura 50. Función de supervivencia. Relación entre supervivencia libre de enfermedad y presencia de CTC prequirúrgicas.

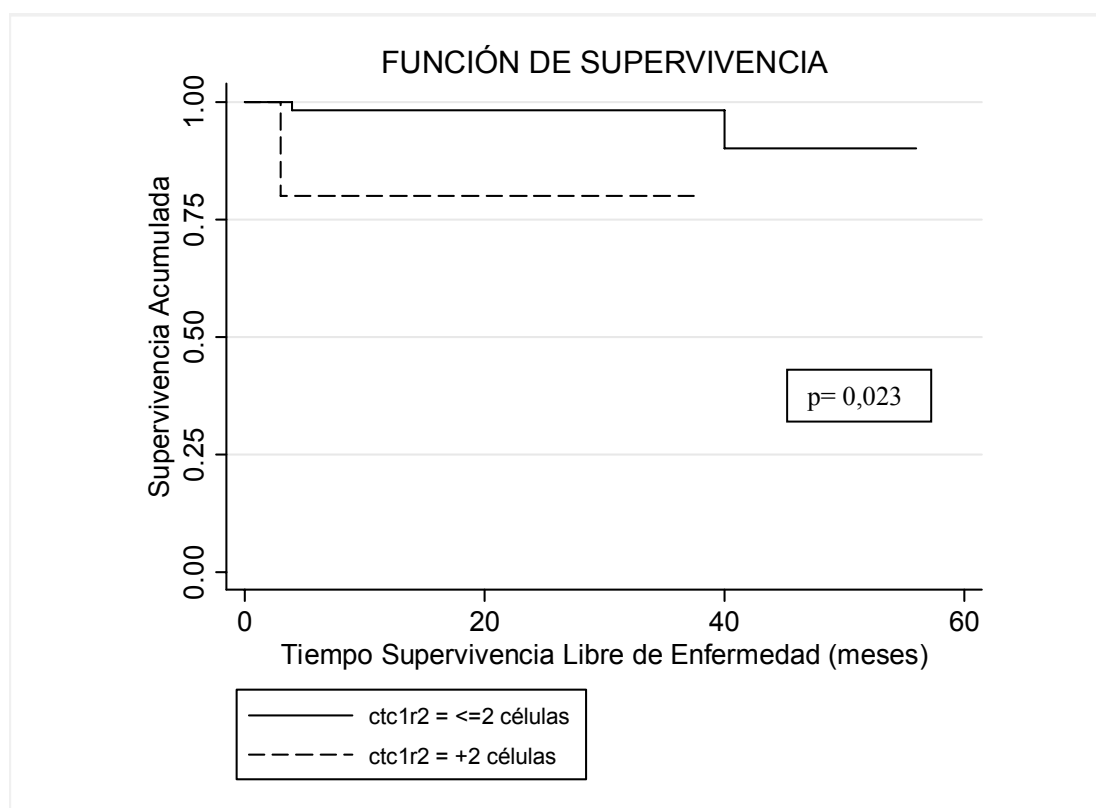


Figura 51. Función de supervivencia. Relación entre supervivencia libre de enfermedad y presencia CTC prequirúrgicas mayor o igual a 2.

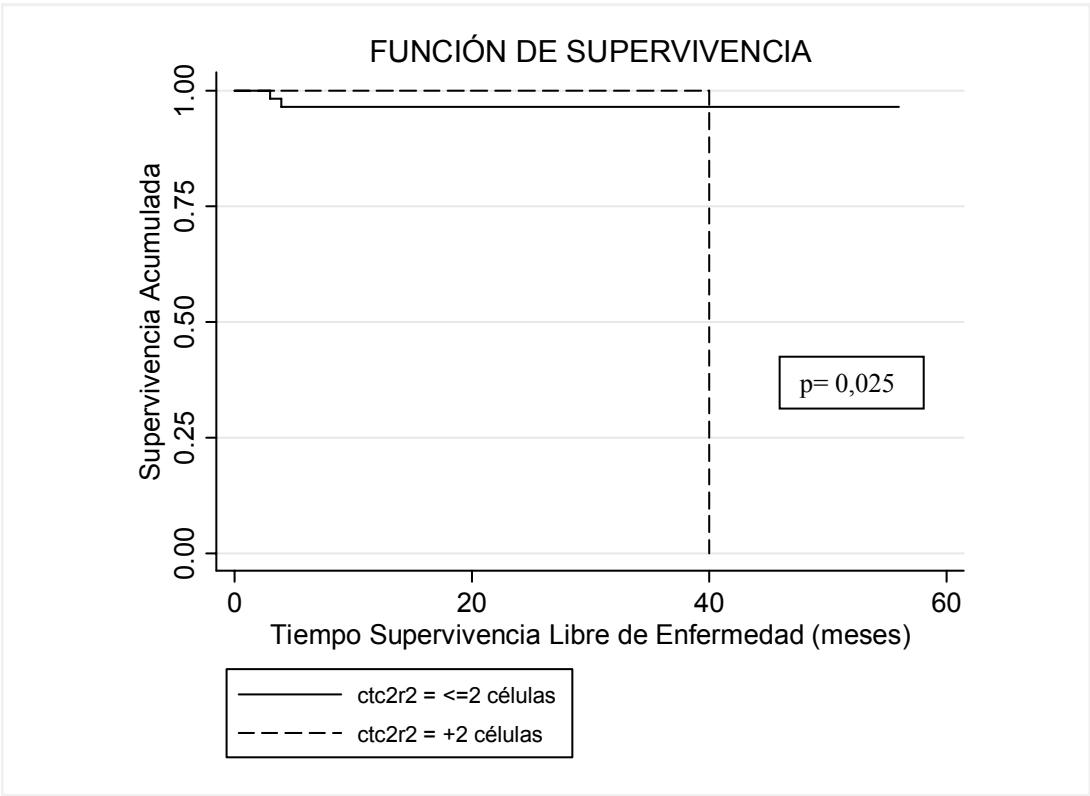


Figura 52. Función de supervivencia. Relación entre supervivencia libre de enfermedad y presencia CTC postquirúrgicas mayor o igual a 2.

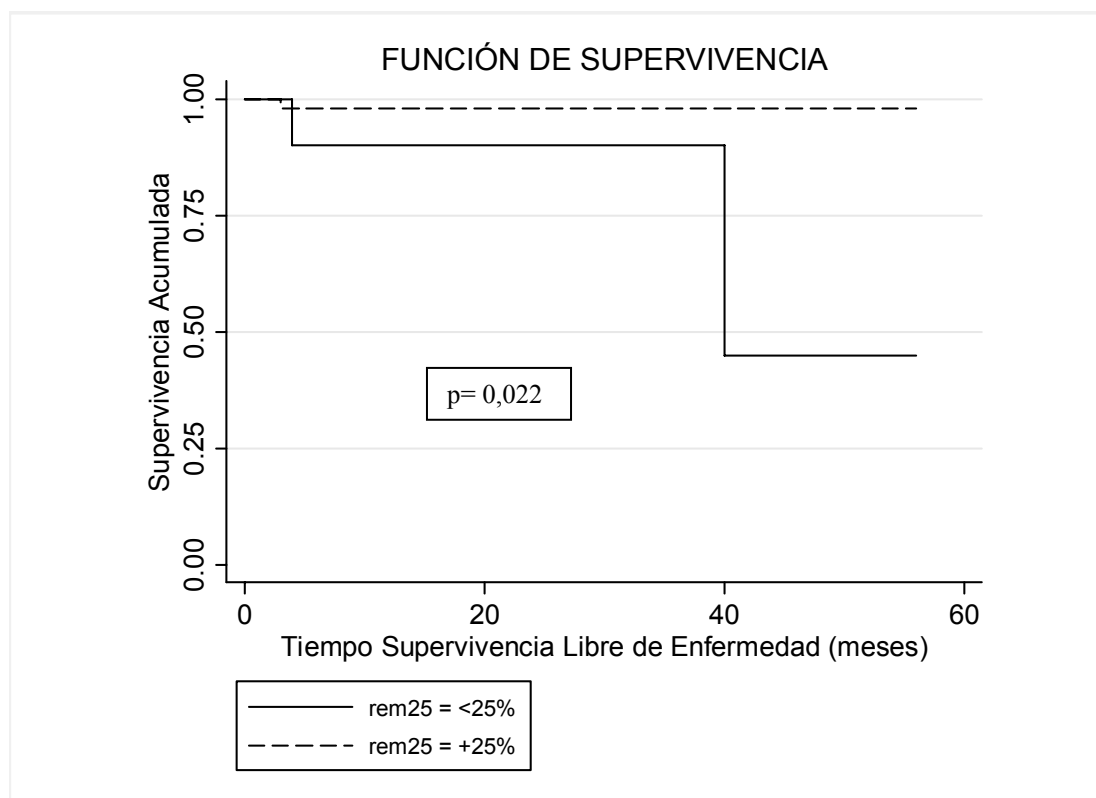


Figura 53. Función de supervivencia. Relación entre supervivencia libre de enfermedad y receptores de estrógenos.

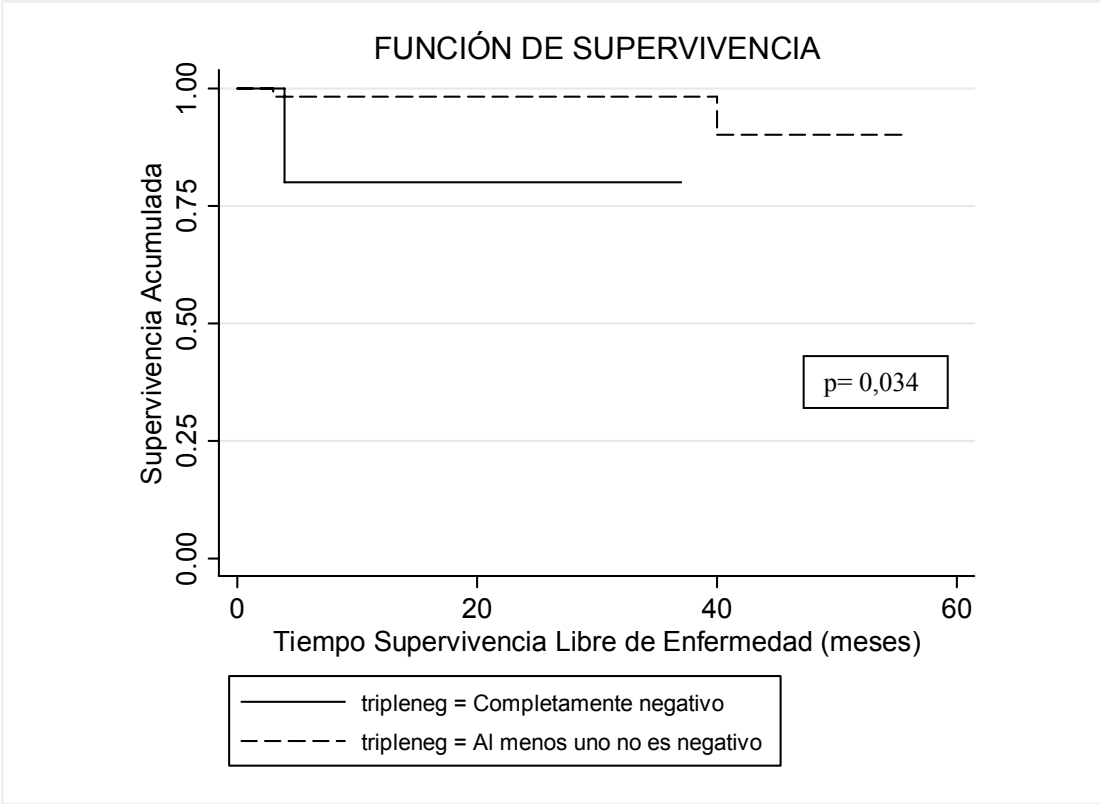


Figura 54. Función de supervivencia. Relación entre supervivencia libre de enfermedad y fenotipo tumoral triple negativo.

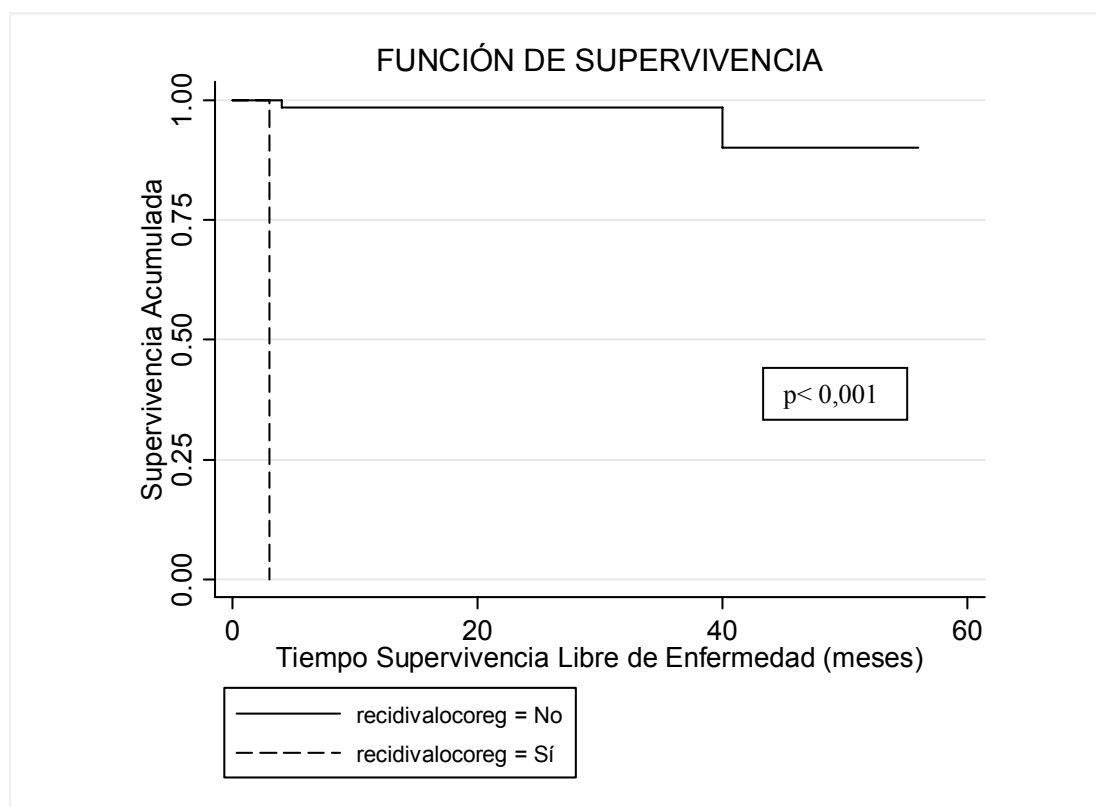


Figura 55. Función de supervivencia. Relación entre supervivencia libre de enfermedad y recidiva loco-regional.

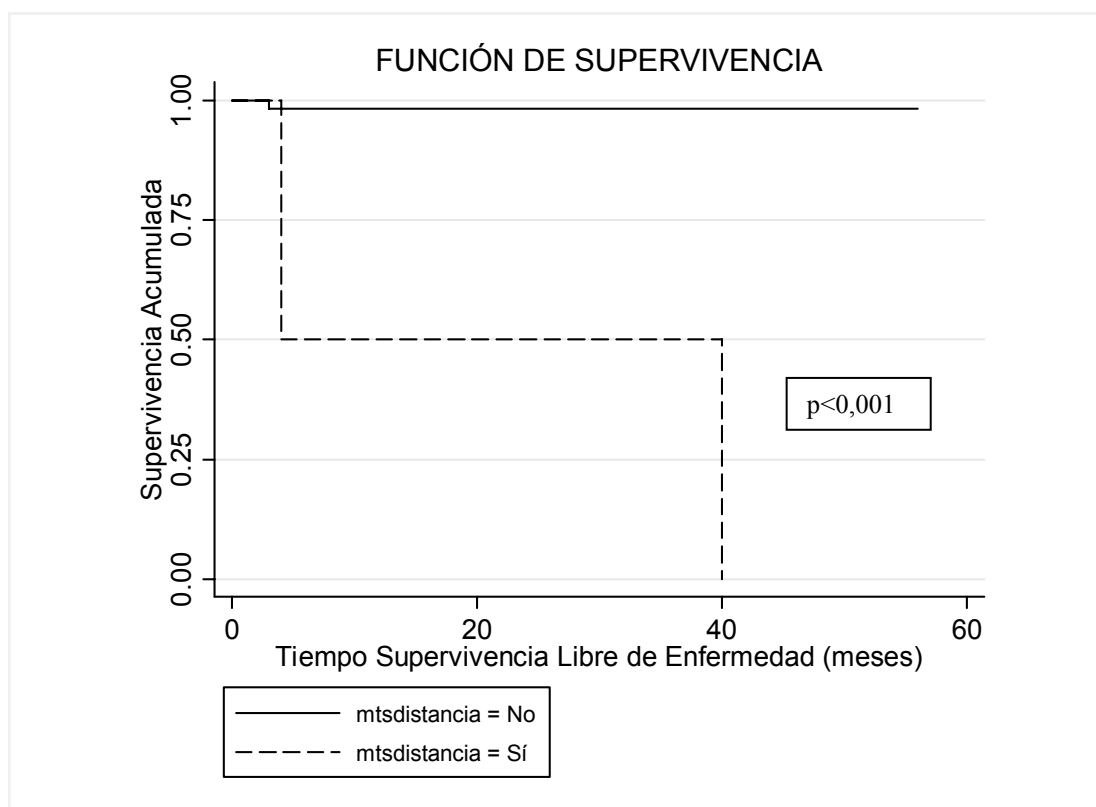


Figura 56. Función de supervivencia. Relación entre supervivencia libre de enfermedad y metástasis a distancia.

Tabla 44. Supervivencia Libre de Enfermedad: análisis de supervivencia en meses a los 6, 12, 36 y 48 meses.

	6 m				12 m				36 m				48 m			
	%	IC95% INF	IC95% SUP	n	%	IC95% INF	IC95% SUP	n	%	IC95% INF	IC95% SUP	n	%	IC95% INF	IC95% SUP	N
SLE (N=60)	96,7	87,3	99,2	58	96,7	87,3	99,2	58	96,7	87,3	99,2	58	88,6	59,3	97,2	57
VARIABLES	6 m				12 m				36 m				48 m			
	%	IC95% INF	IC95% SUP	n	%	IC95% INF	IC95% SUP	n	%	IC95% INF	IC95% SUP	n	%	IC95% INF	IC95% SUP	n
CTC1																
<=2células (n=54)	98,2	87,6	99,7	53	98,2	87,6	99,7	53	98,2	87,6	99,7	53	90,0	57,7	98,0	52
+2células (n=5)	80,0	20,4	96,9	4	80,0	20,4	96,9	4	80,0	20,4	96,9	4	80,0	20,4	96,9	4
CTC2																
<=2células (n=57)	96,5	86,7	99,1	55	96,5	86,7	99,1	55	96,5	86,7	99,1	55	96,5	86,7	99,1	55
+2células (n=2)	100,0	0,0	0,0	2	100,0	0,0	0,0	2	100,0	0,0	0,0	2	0,0	0,0	0,0	1
CTC1 (ctc1r3)																
0 células (n=41)	100,0	0,0	0,0	41	100,0	0,0	0,0	41	100,0	0,0	0,0	41	90,9	50,8	98,7	40
1 - 4 células (n=18)	88,9	62,4	97,1	16	88,9	62,4	97,1	16	88,9	62,4	97,1	16	88,9	62,4	97,1	16
CTC2																
0 células (n=41)	97,6	83,9	99,7	40	97,6	83,9	99,7	40	97,6	83,9	99,7	40	97,6	83,9	99,7	40
1 - 4 células (n=18)	94,4	66,6	99,2	17	94,4	66,6	99,2	17	94,4	66,6	99,2	17	78,7	31,8	95,1	16
CTC (Suma 1+2)																
Ninguna célula (n=30)	100,0	0,0	0,0	30	100,0	0,0	0,0	30	100,0	0,0	0,0	30	100,0	0,0	0,0	30
Al menos una (n=29)	93,1	75,1	98,2	27	93,1	75,1	98,2	27	93,1	75,1	98,2	27	79,8	39,7	94,6	26
GC (p/n)																
Negativo (n=50)	96,0	84,9	99,0	48	96,0	84,9	99,0	48	96,0	84,9	99,0	48	87,3	56,5	96,8	47
Positivo (n=10)	100,0	0,0	0,0	10	100,0	0,0	0,0	10	100,0	0,0	0,0	10	100,0	0,0	0,0	10
MG																
Negativo (n=54)	96,3	86,0	99,1	52	96,3	86,0	99,1	52	96,3	86,0	99,1	52	88,3	59,4	97,1	51
Positivo (n=6)	100,0	0,0	0,0	6	100,0	0,0	0,0	6	100,0	0,0	0,0	6	100,0	0,0	0,0	6
CK19																
Negativo (n=55)	96,4	86,2	99,1	53	96,4	86,2	99,1	53	96,4	86,2	99,1	53	87,6	56,4	97,0	52
Positivo (n=5)	100,0	0,0	0,0	5	100,0	0,0	0,0	5	100,0	0,0	0,0	5	100,0	0,0	0,0	5
PCR																
Negativo (n=53)	96,2	85,7	99,0	51	96,2	85,7	99,0	51	96,2	85,7	99,0	51	87,5	56,5	96,9	50
Positivo (n=7)	100,0	0,0	0,0	7	100,0	0,0	0,0	7	100,0	0,0	0,0	7	100,0	0,0	0,0	7

%: Porcentaje de supervivencia; n: número de pacientes en riesgo; IC95%: intervalo de confianza del 95% para el porcentaje de supervivencia.

Tabla 45. Supervivencia Libre de Enfermedad: análisis de supervivencia en meses a los 6, 12, 36 y 48 meses [continuación]

VARIABLES	6 m				12 m				36 m				48 m			
	%	IC95% INF	IC95% SUP	n	%	IC95% INF	IC95% SUP	n	%	IC95% INF	IC95% SUP	n	%	IC95% INF	IC95% SUP	n
RECIDIVA LOCOREGIONAL																
No (n=59)	98,3	88,6	99,8	58	98,3	88,6	98,3	58	98,3	88,6	98,3	58	90,1	57,5	98,1	57
Sí (n=1)	0,0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0,0	0
MTS DISTANCIA																
No (n=58)	98,3	88,4	99,8	57	98,3	88,4	99,8	57	98,3	88,4	99,8	57	98,3	88,4	99,8	57
Sí (n=2)	50,0	0,6	91,0	1	50,0	0,6	91,0	1	50,0	0,6	91,0	1	0,0	0,0	0,0	0
ECOGRAFIA																
No (n=6)	83,3	27,3	97,5	5	83,3	27,3	97,5	5	83,3	27,3	97,5	5	83,3	27,3	97,5	5
Sí (n=54)	98,2	87,6	99,7	53	98,2	87,6	99,7	53	98,2	87,6	99,7	53	89,6	56,2	97,9	52
RE (<25%/+25%)																
< 25% (n=10)	90,0	47,3	98,5	9	90,0	47,3	98,5	9	90,0	47,3	98,5	9	45,0	1,0	87,1	8
+ 25% (n=49)	98,0	86,4	99,7	48	98,0	86,4	99,7	48	98,0	86,4	99,7	48	98,0	86,4	99,7	48
RP (<25%/+25%)																
< 25% (n=14)	92,9	59,1	99,0	13	92,9	59,1	99,0	13	92,9	59,1	99,0	13	92,9	59,1	99,0	13
+ 25% (n=44)	97,7	84,9	99,7	43	97,7	84,9	99,7	43	97,7	84,9	99,7	43	87,4	49,4	97,5	42
TRIPLE NEGATIVO																
Completamente negativo (n=5)	80,0	20,4	96,9	4	80,0	20,4	96,4	4	80,0	20,4	96,4	4	80,0	20,4	96,4	4
Al menos uno no es negativo (n=55)	98,2	87,8	99,7	54	98,2	87,8	99,7	54	98,2	87,8	99,7	54	89,6	56,1	98,0	53

%: Porcentaje de supervivencia; n: número de pacientes en riesgo; IC95%: intervalo de confianza del 95% para el porcentaje de supervivencia.

III.C. ANÁLISIS DE RIESGOS PROPORCIONALES PARA SUPERVIVENCIA GLOBAL

Una vez establecidas las variables que influyen en la supervivencia global, analizamos la importancia relativa de los factores pronóstico, valorada con el modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox. Este modelo de análisis permite establecer cuáles de los factores relacionados con supervivencia global presenta valor pronóstico independiente. Tabla 46.

Las variables significativas para supervivencia global mediante regresión de Cox fueron únicamente la presencia de metástasis a distancia, de recidiva loco-regional y la detección de CTC(1+2) o detección de CTC pre o postoperatoriamente.

La probabilidad de fallecer de las pacientes con detección de CTC antes o después de la cirugía fue 4,71 veces superior a la de las pacientes en las que no se detectaron CTC en ninguno de los dos momentos (HR: 4,72, IC95%: 1,11-19,06)

La probabilidad de fallecer de las pacientes que, durante el seguimiento, presentaron una recidiva en forma de metástasis a distancia o de recidiva loco-regional fue 58 y 52 veces superior que aquellas que no presentaron recidivas. (HR: 58,50, IC95%:3,66-935 y HR:52,35, IC95%: 4-682).

Tabla 46. Supervivencia Global. Análisis univariable mediante regresión de COX.

Variables cuantitativas	HR	IC95% (inferior)	IC95% (superior)	p*
CTC (suma CTC1+CTC2) (n=59)	4,71	1,11	19,06	0,017
Variables cualitativas				
RECIDIVA LOCOREGIONAL				
No (n=59) (ref.) / Si (n=1)	58,50	3,66	935,26	0,020
METASTASIS A DISTANCIA				
No (n=58) (ref.) / Si (n=2)	52,35	4,02	682,27	0,003

IC95%: intervalo de confianza del 95% de HR; HR calculado mediante la Regresión de Cox, modelo de riesgos proporcionales.

* Nivel de significación calculado por el test -2LL, nivel de referencia p=0,05. (ref.): categoría de referencia.

III.D. ANÁLISIS DE RIESGOS PROPORCIONALES PARA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD

Analizamos la importancia relativa de de cada una de las variables pronósticas que influyen en la supervivencia libre de enfermedad. Tabla 47.

Sólo las variables *CTC*, *CTC-categorizada*, *recidiva loco-regional* y *MTS-distancia* resultaron significativas. Sin embargo la estabilidad de la medida de efecto, HR, se mostró casi nula para las dos primeras variables cuantitativas: *recidiva loco-regional* y *CTC categorizada*, ya que tendían al infinito aunque su nivel de significación fuese menor de 0,05; por lo que solamente CTC y MTS-distancia se tuvieron en cuenta.

La probabilidad de recaer de los pacientes en las que se ha detectado CTC en el momento prequirúrgico o postquirúrgico es 5,05 veces superior a la de las pacientes en las que no se ha detectado CTC en ninguno de los dos momentos.

Tabla 47. Supervivencia Libre de Enfermedad. Análisis univariable mediante regresión de Cox.

Variables cuantitativas	HR	IC95% (inferior)	IC95% (superior)	p*
CTC (suma CTC1+CTC2) (n=59)	5,05	1,15	22,13	0,014
Variables cualitativas				
CTC (categorizado; suma CTC1+CTC2)				
Ninguna (n=30) (ref.) / Al menos una (n=29)	5,00E+15	0,00	-	0,047
RECIDIVA LOCOREGIONAL				
No (n=59) (ref.) / Sí (n=1)	5,95E+16	0,00	-	0,004
METASTASIS A DISTANCIA				
No (n=58) (ref.) / Sí (n=2)	43,34	3,74	501,33	0,004

IC95%: intervalo de confianza del 95% de HR; HR calculado mediante la Regresión de Cox, modelo de riesgos proporcionales.

* Nivel de significación calculado por el test -2LL, nivel de referencia p=0,05. (ref.): categoría de referencia

III.E. ECUACIÓN DEL MODELO FINAL DE REGRESIÓN DE COX PARA SG Y SLE.

Una vez realizado el análisis univariable se procedió al análisis multivariable ajustando el modelo final por las variables que se hallaron significativas: CTC, Recidiva Loco-Regional y MTS-distancia para SG y CTC y MTS-distancia para SLE. Se introdujeron dichas variables obteniéndose modelos bastante inestables ya que como regla, al menos se necesitan 10 eventos (muertes/recidivas) por cada variable que se introduzca en el modelo, en este caso sólo se registraron 3 eventos para cada tipo de supervivencia evaluada, por lo que se decidió sólo incluir una variable predictiva en el análisis, y la que mejor respondió fue CTC. Tabla 48Tabla 49. Concluyéndose que, tanto para SG como para SLE ajustada por CTC, se definieron las siguientes ecuaciones:

Ecuación del modelo final para SG:

$$\frac{h(t)}{h_0(t)} = e^{(1,549 \cdot CTC)}$$

Ecuación del modelo final para SLE:

$$\frac{h(t)}{h_0(t)} = e^{(1,618 \cdot CTC)}$$

Interpretación de los resultados:

El HR global para SG fue de 4,71. Esto significa que globalmente la tasa de mortalidad fue de 4,71 veces superior cada vez que se aumentaba una unidad de cambio en la variable CTC, es decir, si la unidad de cambio en CTC fue una célula (CTC aumenta una célula en una célula), frente a las mujeres que presentan 0 CTC, la que tenga una célula (1 CTC) tuvo una tasa de mortalidad de 4,71 veces mayor que la que no. Si se quiere averiguar cuál sería la tasa de mortalidad en una paciente que tuvo 2 CTC, se multiplicaría el coeficiente B por dos y se aplicaría antilogaritmos neperianos obteniéndose que su tasa de mortalidad sería 9,42 veces superior en comparación con aquella mujer que obtuvo 0 CTC.

Lo mismo ocurre con HR para SLE de 5,05. Esto significa que la tasa de recidiva fue de 5,05 veces superior cada vez que aumentaba una unidad de cambio en la variable CTC. Por tanto, una mujer con 1CTC presentaría una tasa de recidiva 5,05 veces más que una mujer con 0CTC. Lo mismo ocurre con una mujer con 2CTC, habría que multiplicar el coeficiente B por este valor y aplicar antilogaritmos neperianos, finalmente se obtendría que 10,1 veces más en comparación con aquella que tiene 0CTC.

Tabla 48. Supervivencia Global. Modelo final para las pacientes de cáncer de mama ajustado por CTC.

Pacientes de Cáncer de Mama	B	EE	HR	IC 95%	p*
CTC (continua) (n=59)	1,549	0,737	4,71	1,11 – 19,06	0,017

B: Coeficiente del modelo B de regresión; EE: Error Estándar del Coeficiente B; IC95%: intervalo de confianza del 95% de HR;
CTC: Células tumorales periféricas (pre-postquirúrgicas).

* Nivel de significación calculado por el test -2LL. HR calculado mediante la Regresión de Cox, modelo de riesgos proporcionales.

Tabla 49. Supervivencia libre de enfermedad. Modelo final para las pacientes de cáncer de mama.

Pacientes de Cáncer de Mama	B	EE	HR	IC 95%	p*
CTC (continua) (n=59)	1,618	0,754	5,05	1,15 – 22,13	0,014

B: Coeficiente del modelo B de regresión; EE: Error Estándar del Coeficiente B; IC95%: intervalo de confianza del 95% de HR;
CTC: Células tumorales periféricas (pre-postquirúrgicas)

* Nivel de significación calculado por el test -2LL. HR calculado mediante la Regresión de Cox, modelo de riesgos proporcionales

DISCUSIÓN

El cáncer de mama constituye un problema social y sanitario de primer orden ya que es el tumor maligno más frecuente en la mujer en países desarrollados.

Las metástasis son la principal causa de muerte relativa al cáncer. Desde que se instauró la concepción del cáncer de mama como una enfermedad sistémica, se ha evolucionado en un tratamiento cada vez más conservador desde el punto de vista regional y se ha estudiado los factores pronóstico que más pueden influir en la evolución de la enfermedad.

Los avances en el diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama son muy significativos; no obstante, el 25% de pacientes con enfermedad localizada y ausencia de afectación axilar presentará recidiva sistémica a pesar de un aparente tratamiento primario exitoso, mientras el 30% de las pacientes con afectación axilar inicial no recidivan en los siguientes 5-10 años¹¹⁸. Estos datos sugieren la existencia de factores que influyen en la dispersión hematógica del cáncer, diferentes al estadio ganglionar.

Al mismo tiempo, sabemos que existen pacientes con enfermedad de buen pronóstico que no va a recidivar, las cuales están recibiendo tratamiento quimioterápico que realmente no necesitarían, por lo que están sufriendo así efectos secundarios innecesarios. Poder discernir cuáles son estas pacientes es el objetivo primordial de las investigaciones actuales en cáncer de mama.

Algunos de los nuevos factores pronósticos y predictivos, como la inmunohistoquímica y, muy recientemente, los perfiles genéticos, están cambiando

radicalmente el manejo del cáncer de mama y han demostrado que el conocimiento de los mecanismos biológicos y moleculares pueden proporcionar información fundamental para un tratamiento individualizado y específico.

Sin embargo, los factores utilizados actualmente continúan sin ser suficientes para la predicción de la evolución y, hasta ahora, el estadio ganglionar continúa siendo la piedra angular en el pronóstico y tratamiento del cáncer de mama.

El objetivo de este estudio es valorar la utilidad como factor pronóstico del estudio molecular del ganglio centinela y de la detección de células tumorales circulantes en pacientes diagnosticadas de carcinoma de mama en estadios iniciales.

I. ESTUDIO DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES

Desde el momento en el que el cáncer de mama se hace infiltrante, existe la posibilidad de diseminación celular del mismo al torrente circulatorio. La identificación de Células Tumorales Circulantes (CTC) tiene el potencial de convertirse en uno de los test oncológicos más útiles, al relacionarse con peor pronóstico debido a progresión de metástasis a distancia¹¹⁹.

Los primeros y principales estudios sobre CTC se han centrado en cáncer metastático, demostrando ser un predictor independiente de supervivencia total y libre de enfermedad¹²⁰. En 2004, Cristofanilli y colaboradores demostraron por primera vez la asociación de CTC, detectadas por el sistema de inmunoelectroforesis semiautomático CellSearch, con peor pronóstico en cáncer de mama metastático⁹⁵.

Concretamente, se analizó la sangre de 177 pacientes con diagnóstico de cáncer de mama metastático antes del comienzo de un nuevo tratamiento quimioterápico. Las pacientes con 5 o más CTC antes del tratamiento quimioterápico presentaron una supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global menor que las que presentaron menos de 5 CTC.

Basándose en estos datos, se han desarrollado numerosos estudios para profundizar en el conocimiento de las CTC y en su utilidad como factor pronóstico y predictivo.

La identificación de CTC en cualquier momento durante el tratamiento quimioterápico también se ha estudiado como predictor de mortalidad en cáncer metastático^{98,100} y se ha comparado la evaluación de respuesta al tratamiento por CTC y por técnicas de imagen, considerando el primero un indicador más temprano y reproducible de supervivencia global¹²¹.

En el cáncer de mama avanzado no metastático, la detección de CTC previa al tratamiento neoadyuvante ha demostrado ser un potente factor pronóstico. Además, la

evolución de la cuantificación de CTC antes y después del tratamiento neoadyuvante se ha relacionado con respuesta al tratamiento y con evolución de la enfermedad.^{102,103,104}

Sin embargo existen pocos estudios que relacionen CTC con cáncer de mama en estadios iniciales¹¹⁹.

En la actualidad el peso de la evidencia apoya el papel de CTC como indicador pronóstico. Sin embargo, son necesarios mayores estudios en cáncer de mama en estadios iniciales para posibilitar su incorporación a la práctica clínica diaria.^{120,122}

Este estudio plantea la detección de CTC en sangre en pacientes diagnosticadas de carcinoma de mama precoz, sin afectación ganglionar clínica ni ecográfica (N0), con indicación de cirugía primaria y biopsia de ganglio centinela. Estudia su relación con el estado del ganglio centinela y del resto de factores pronóstico en el momento del diagnóstico, y su posible utilidad como marcador de riesgo de progresión de la enfermedad.

También estudia la posible influencia de la cirugía en el número de CTC detectadas. Esto se realiza valorando la diferencia en el resultado de la detección pre o postquirúrgica de CTC, considerando la posibilidad de una diseminación de CTC durante el acto quirúrgico. A su vez se estudia la posible influencia de los cambios en el número de CTC en la evolución de la enfermedad.

Por último, analiza el estudio biomolecular por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) de mamoglobina y citoqueratina en el ganglio centinela, para compararlo al estudio clásico con hematoxilina-eosina del ganglio centinela y su relación con la detección de CTC.

Se incluyeron en el estudio 75 pacientes con carcinoma operable de mama sin afectación clínica axilar (T1N0-T2N0 clínico). De las cuales 15 se invalidaron durante el proceso por lo que el tamaño muestral definitivo fueron 60 pacientes. Todas ellas (N:60) tratadas con cirugía primaria (conservadora o radical según indicación) y técnica del ganglio centinela, seguido de la correspondiente linfadenectomía en caso necesario.

Se realizó detección de CTC pre y postquirúrgicas y RT-PCR para Citoqueratina 19 y mamoglobina en una sección del ganglio centinela al mismo tiempo que se llevaba a cabo la técnica clásica de análisis de ganglio centinela. No se tuvieron en cuenta los resultados de este estudio para las indicaciones de tratamiento sistémico de las pacientes incluidas en el estudio.

En la muestra, la media de edad fueron 58 años, el porcentaje de cirugía conservadora fue de 63%. En el 17% (n=10) de los casos, la biopsia de ganglio centinela resultó positiva para malignidad, por lo que se realizó linfadenectomía en el mismo acto quirúrgico. Se encontró un solo falso negativo de ganglio centinela (1,6%). De los casos con ganglio centinela positivo, el 80% (8 casos) presentaron sólo un ganglio centinela positivo.

La detección de CTC prequirúrgica (CTC1) fue positiva ($CTC1 \geq 1$) en el 30,5% de los casos, y negativa o igual a cero ($CTC1 = 0$) en el 69,5% restante de pacientes, en el 8,5% el número de CTC1 fue igual o mayor a 2 y en ningún caso superó 5 CTC.

El análisis postquirúrgico de CTC (CTC2) se obtuvo igualmente un resultado de CTC2 mayor o igual a uno ($CTC2 \geq 1$) del 30,5% y CTC2 negativas o igual a cero ($CTC2 = 0$) del 69,5%, no diferenciándose de los hallazgos en la detección prequirúrgica. En cambio, únicamente se objetivaron CTC2 mayor o igual a 2 ($CTC \geq 2$) en 2 pacientes (3,4%), menor número de pacientes que en la detección prequirúrgica, y tampoco superaron en ningún caso la cifra de 5 CTC.

Este es el primer trabajo que estudia de la detección de CTC en cáncer de mama sin afectación clínica axilar, únicamente en estadios N0 clínicos, con indicación de técnica de ganglio centinela. No obstante, el peso de las conclusiones de los estudios de cáncer metastático y localmente avanzado hace pensar que la detección de CTC será de utilidad en cáncer de mama en estadios iniciales y ya existen estudios de CTC de cáncer de mama no metastásico, en los cuales cada vez se incluyen pacientes en estadios más precoces.

La tasa de 30% de detección de CTC en este estudio coincide con los estudios más relevantes de detección de CTC en cáncer de mama en estadios iniciales, en los que la tasa de detección oscila entre el 18 y el 30%¹²³.

El grupo de la M.D Anderson¹²⁴ presenta un estudio en el que relaciona la detección de células de cáncer de mama circulantes (CTC) y en médula ósea (DTCs) de 92

pacientes con cáncer de mama precoz (T1-T2) con otros factores pronóstico. Presenta una tasa de detección de CTC del 31% de pacientes, dato coincidente con este estudio.

En un artículo más reciente, Lucci y colaboradores¹²⁵ analizan en un estudio prospectivo la detección de CTC mediante CellSearch System en 302 pacientes estadio T1-T3 de cáncer de mama sin tratamiento quimioterápico previo. Se detectó una o más CTC en el 24% de pacientes.

La tasa de detección de CTC en nuestro estudio es ligeramente superior aunque similar los datos hallados en los tres principales ensayos clínicos en cáncer de mama no metastático que existen en la actualidad, en fase de recogida de datos en el momento actual. El estudio SUCCESS-A, que muestra una detección del 22% de células circulantes antes y después de la quimioterapia adyuvante¹²³, el estudio GeparQuattro¹⁰³ que detecta un 22% de pacientes con CTC previa al tratamiento quimioterápico neoadyuvante y al REMAGUS 02¹²⁶ que presenta un 23% de detección en un estudio de CTC en referencia a quimioterapia neoadyuvante.

La tasa de detección de CTC1 mayor o igual a 2 ($CTC1 \geq 2$) en nuestro estudio es del 8,5%. Este dato es concordante con los estudios similares que lo especifican, como el estudio de Lucci y colaboradores, que presentó 2 o más CTC en el 10% de los casos¹²⁵ o el ensayo clínico SUCCESS- A que presenta un 9% de detección $CTC \geq 2$.¹²⁷

En nuestro estudio la tasa de detección referida a CTC > 5 es igual a cero, esto probablemente se debe a que se estudia carcinoma de mama muy precoz, con diseminación hematológica muy escasa.

El número de CTC utilizado como punto de corte en nuestro estudio es de 1 CTC. Los primeros estudios que demostraron la relación de CTC con supervivencia en cáncer de mama metastásico utilizaron como punto de corte 5 CTC.⁹⁵ Sin embargo, el punto de corte de 5 CTC sería demasiado inusual en estadios iniciales y serían necesarios muchos casos para obtener 1 paciente con 5 o más CTC. Además la presencia de una única CTC ya informa de peor pronóstico por lo que, según los resultados de nuestro estudio, en cáncer de mama inicial debe tomarse como referencia 1 CTC como resultado positivo.

Existe suficiente evidencia científica como para tomar de referencia 1 CTC en el cáncer de mama no metastático, ya que es válido como factor pronóstico. En el ensayo clínico REMAGUS02 concluyen que incluso la detección de 1 CTC en cáncer de mama avanzado no metastático se relaciona con aparición de metástasis y que por tanto no se precisa instaurar un punto de corte mayor en estos casos.¹²⁶ El estudio SUCCESS-A utiliza también como punto de corte 1 CTC y, aunque encuentra que el riesgo de recurrencia y muerte por cáncer se incrementa en relación con el número de CTC detectadas al comparar $CTC \geq 1$ y $CTC \geq 5$, la supervivencia global y libre de enfermedad en este estudio fue significativamente menor en todos los subgrupos (con diferente número de CTC detectadas) comparada con las pacientes con $CTC=0$ por lo que consideran justificable tomar el punto de corte en 1 CTC.¹²⁷

En nuestro estudio se incluyeron únicamente pacientes sin afectación ganglionar (N0 clínico y ecográfico), con indicación de biopsia de ganglio centinela. En relación con ello, el tamaño tumoral en el momento del diagnóstico fue de 17 mm de media, dentro de T1-T2 en el 100% de los casos, con una distribución según la clasificación TNM en el que el 70% fue clasificado como T1, el 30% como T2 y no se encontró ningún caso de tamaño tumoral mayor de 5cm, T3, en la muestra. Tras la cirugía y la técnica de ganglio centinela, en 49 pacientes (el 81,7% de los casos) se confirmó la ausencia de afectación ganglionar.

Esta proporción difiere de la mayoría de los estudios realizados hasta ahora. El estudio más semejante, el grupo de MD Anderson¹²⁴ presenta una muestra con tamaño tumoral semejante aunque ligeramente mayor (media 2,1mm) pero con una tasa de afectación ganglionar mucho mayor, del 43% comparado con el 18% de nuestro estudio.

En el siguiente estudio, Lucci y colaboradores clasifican a las pacientes como T1-T2 en el 89% de los casos, con un 37% de afectación ganglionar.¹²⁵ En el estudio REMAGUS 02¹²⁶ el 55% de las pacientes se clasificaron como T1 o T2 y sólo el 38% de ellos estaban libres de afectación ganglionar.

Es decir, estudiamos la relación y valor pronóstico de CTC en cáncer de mama en estadios más iniciales que los estudios realizados hasta ahora. La enfermedad en estos estadios presenta a priori buen pronóstico general, según los factores pronósticos clásicos, por lo que detectar de entre ellas, con ayuda de CTC, las escasas pacientes con alto riesgo de recidiva daría una información fundamental de cara al tratamiento y seguimiento de estas pacientes.

La detección de CTC parece ser un factor pronóstico por su relación con la diseminación hematógica temprana, independiente del resto de factores pronóstico conocidos. En nuestro estudio no hay relación estadísticamente significativa entre su detección y las características clinicopatológicas ni inmunohistoquímicas del tumor. Sin embargo existe un aumento no significativo de detección de CTC1 (previo a cirugía) en las pacientes con multifocalidad, con tamaño tumoral mayor, con afectación ganglionar, con la positividad HER2 y con la ausencia de receptores hormonales.

En la detección postquirúrgica de CTC (CTC2) no se encuentran estas relaciones con las características del tumor, objetivando una distribución homogénea de CTC2 en pacientes con diferente tamaño tumoral, ganglio centinela positivo o negativo y diferente inmunohistoquímica. Sin embargo existe una diferencia estadísticamente significativa entre la detección de CTC2 en los diferentes tipos histológicos tumorales, así en el 37% de los casos de carcinoma ductal infiltrante y el 33% de los casos de carcinoma lobulillar se detectaron CTC2 positivas, frente a ningún caso de CTC2 positiva en el resto de tipos tumorales.

En los 2 estudios de MD Anderson que tratan sobre la detección de CTC en carcinoma precoz de mama, encuentran igualmente ausencia de relación estadísticamente significativa con todas de las variables estudiadas del tumor primario.^{124,125}

No obstante, en otros estudios, principalmente centrados en cáncer de mama metastático o avanzado en los que se estudia la relación la detección de CTC con el resto de factores pronóstico, sí se encuentran algunas relaciones con otros factores pronóstico:

Taubert y colaboradores, en 2004, encuentran relación de presencia de CTC con el estadio ganglionar y con la presencia de metástasis macroscópicas, sugiriendo que las CTC pueden estar relacionadas con las características del tumor.¹²⁸

El estudio multicéntrico alemán SUCCESS-A^{123,127} analiza la presencia de CTC tras la cirugía y previa a la quimioterapia, en una cohorte de 2.026 pacientes con afectación ganglionar o pacientes con enfermedad de alto riesgo sin afectación ganglionar, por lo que se podría comparar con los resultados postoperatorios de nuestro estudio (CTC2), aunque no se presentan resultados preoperatorios lo que resta interés a ese estudio y teniendo en cuenta que incluye pacientes de estadios mucho más avanzados. Este estudio sugiere que la presencia de 1 o más células circulantes en estas pacientes es un predictor independiente de supervivencia total y libre de enfermedad en pacientes con cáncer no metastático.

El estudio SUCCESS-A no encuentra relación entre la detección de CTC y los diferentes parámetros clínico-patológicos como el tamaño tumoral, el grado o la inmunohistoquímica, únicamente encuentra una relación estadísticamente significativa en un mayor hallazgo de CTC positivas entre las pacientes con afectación ganglionar respecto a las que no presentan dicha afectación.¹²⁷ El hecho de que esta relación entre CTC y afectación ganglionar no se encuentre en nuestro estudio podría deberse a presentar una muestra menor de pacientes pero lo más probable es que se deba al diferente grado de afectación ganglionar, ya que en nuestro estudio el 83% de las pacientes presentan ganglio centinela negativo y la gran mayoría de los casos de ganglio positivo presentan una carga tumoral mínima en la metástasis ganglionar (tamaño de metástasis ganglionar de 6.8 mm de media).

También Nakagawa y colaboradores,¹²⁹ en un estudio de 90 pacientes con cáncer de mama estadios I-III, encuentra una relación estadísticamente significativa entre el número de biomarcadores de CTC detectado por RT-PCR y la afectación ganglionar en la linfedenecomía o por biopsia de ganglio centinela.

No obstante otros estudios en los que se presentan estadios avanzados, con mayor afectación ganglionar, como el GeparQuattro en neoadyuvancia, no refieren esta relación entre CTC y afectación ganglionar.¹⁰³

En otros estudios mas pequeños encuentran una relación entre la detección de CTC y el HER2neu. Lang y colaboradores analiza las características clínico-patológicas en relación al hallazgo de CTC en 92 pacientes con cáncer de mama operable y encuentra una relación significativa únicamente con el estatus HER2, sin encontrar relación con afectación ganglionar ni tamaño tumoral. Este estudio presenta una muestra con tumores con estadios más avanzados que nuestro estudio, T1-T4 con un 38% de quimioterapia neoadyuvante.¹³⁰

La diferencia significativa que presenta nuestro estudio entre detección CTC postquirúrgica (CTC2) en subtipo ductal o lobulillar con respecto a la ausencia de detección en los otros subtipos tumorales no está referida en la literatura, bien porque algunos estudios no han estudiado esta variable,¹²⁵ porque aun no se ha tenido en cuenta en los resultados preliminares,¹²⁷ o porque, a pesar de ser estudiado, no ha presentado diferencias significativas entre los diferentes subtipos tumorales, como ocurre en el ensayo clínico GeparQuattro.¹⁰³ Este resultado encontrado en nuestro estudio podría estar

relacionado con el buen pronóstico que presentan en general estos subtipos tumorales minoritarios.

Como conclusión, en un metanálisis realizado por Zhao y colaboradores¹³¹ en el que incluyen 4013 pacientes de 24 estudios, los resultados de la relación de CTC con el resto de características clínico-patológicas del cáncer primario de mama sugieren asociación significativa de éstas con alto grado histológico, tamaño tumoral mayor de 2cm y el estadio ganglionar. Cabe resaltar que este meta-análisis sólo incluye estudios en los que la técnica de detección de CTC fuera la ampliación genómica mediante reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) de uno o más marcadores de células de cáncer de mama y no tiene en cuenta los realizados mediante inmunocitoquímica, como es el caso de nuestro estudio.

La tasa de detección de CTC pre y postoperatoria en nuestro estudio es concordante, del 30% tanto en el análisis preoperatorio como tras la cirugía, con una correlación entre ellas del 73% en los valores negativos y de 39% en los valores positivos. Mediante la prueba exacta de Wilcoxon así como mediante la prueba exacta de homogeneidad marginal se determina que no se detectan diferencias estadísticamente significativas entre CTC1 frente a CTC2, por tanto, se puede concluir que no hay evidencia de que la cirugía modifique los niveles de CTC.

Frente a los múltiples estudios realizados comparando CTC en relación al tratamiento sistémico, existen escasos estudios que comparen y analicen los resultados de la detección de CTC pre y postoperatoria.

Alguno de estos estudios sugieren la posibilidad de que la cirugía provoque una activación del estado de latencia del cáncer de mama¹³² o una suelta de células durante el acto quirúrgico que pudiera contribuir a la diseminación hematógica del cáncer.^{133,134,135}

Ya en 2002, Galán y colaboradores¹³⁴ en un estudio español estudian si la manipulación quirúrgica de cáncer de mama en estadios I-II aumenta la diseminación de CTC detectadas por RT-PCR. En el estudio hacen extracciones de sangre 24 horas previas a la cirugía, 24 horas después, una semana y un mes después de la cirugía en 64 pacientes; con un resultado de 24% de CTC positivas, 7% de ellas prequirúrgicas y 17% restantes postquirúrgicas. Concluyen que la cirugía incrementa la presencia de CTC. Este estudio al presentar resultados unifica las 3 muestras postoperatorias para obtener el total de 17% de detección CTC postoperatorias, sin tener en cuenta que la cantidad de sangre examinada tras la cirugía 3 veces la cantidad de sangre preoperatoria.

Daskalakis y colaboradores analizan la detección de CTC por RT-PCR en 104 mujeres con cáncer de mama estadios I-III en 4 momentos referentes a la cirugía: prequirúrgico, postquirúrgico, tras 24 horas y 15 días después de la cirugía. Al igual que en nuestro estudio, no encontraron diferencias significativas entre los diferentes momentos de detección de CTC.¹³⁶

Por el contrario, Hu y colaboradores, en otro estudio de las mismas características, sí encuentran elevación de CTC. En él analizan la sangre de 49 pacientes con diagnóstico de cáncer de mama en diferentes estadios, mediante RT-PCR, tomando muestras el día previo a la cirugía, el día posterior y una semana después de la misma; presenta un

aumento de células en la muestra postquirúrgica, que luego desciende en la toma realizada a la semana. No obstante, tras 33 meses de seguimiento, no encuentran relación entre este aumento de células y el desarrollo de metástasis. Concluyen que es improbable que las células tumorales que entran en la circulación sanguínea a causa de la cirugía estén involucradas en la formación de metástasis.¹¹²

Para estudiar la influencia de la cirugía en la presencia de CTC,¹³³ Camara y colaboradores realizan una monitorización de éstas en 52 pacientes con CTC positivas y cáncer de mama en diferentes estadios. Realiza una detección de CTC previa a la cirugía, tras 30min, 60min, 3 y 7 días tras cirugía y en el posterior seguimiento de las pacientes. Todas las pacientes presentaban CTC prequirúrgicas. No se encontraron diferencias entre las detecciones prequirúrgicas y muestras tomadas el primer día postoperatorio. En cambio, se produjo un aumento de células epiteliales a partir de los días 3 y 4 sucesivos a la cirugía, que luego disminuyó en la muestra del día 7, pero en el 58% de los casos continuó por encima de los valores prequirúrgicos. Concluyen que parte de la diseminación celular debida a la cirugía está compuesta probablemente por células epiteliales no tumorales que desaparecen en pocos días pero otras, probablemente tumorales, permanecen en la circulación largo tiempo en estado latente pero con capacidad de asentarse y crear una metástasis si las condiciones son adecuadas, incluso largo tiempo después. Propone que, no la cuantificación aislada sino la monitorización de la evolución de CTC y el estudio de las características tumorales de estas células darán más información sobre el riesgo de metástasis. Este estudio presenta pacientes con cáncer de mama de T1N0 a T4, todas ellas con CTC presentes desde el inicio del estudio por lo que presenta mayor detección y variación de CTC durante la cirugía que el nuestro, los hallazgos en las dos

primeras detecciones postquirúrgicas, los comparables con nuestro estudio por el momento de toma de la muestra, son concordantes con nuestro estudio y no relaciona específicamente los hallazgos en las muestras del tercer y séptimo día con la evolución de las pacientes.

En otro estudio del mismo equipo,¹³⁵ se estudia la posibilidad de que las intervenciones diagnósticas y terapéuticas sobre los pacientes pudieran contribuir la movilización de células desde el tumor primario a la circulación. Estudian la influencia de la realización de mamografías, la cirugía y el tratamiento sistémico con taxanos principalmente. Sin embargo, para valorar la influencia de la cirugía en la presencia de CTC, compara pacientes tratados con neoadyuvancia (previo a cirugía) con pacientes tratados con tratamiento adyuvante (post-cirugía). Tras un seguimiento de 2,2 años presenta mayor número de recidivas en pacientes con número ascendente de CTC que en pacientes con número descendente de CTC, aunque la diferencia únicamente es significativa en el grupo de neoadyuvancia. Concluye que el aumento de número de CTC durante cualquier tipo de tratamiento o después del mismo puede ser referencia de recurrencia de enfermedad. Este estudio compara la presencia de CTC en dos grupos pacientes con características tumorales diferentes entre ellas (aquellas con indicación de tratamiento neoadyuvante versus quirúrgico primario) y por tanto, hace muy difícilmente valorable la conclusión de que la diferencia de CTC sea debido específicamente a la cirugía.

Existen escasos estudios que presenten resultados de CTC prequirúrgicos.

Los grandes ensayos clínicos en cáncer de mama no metastático toman como muestra basal de CTC la previa al tratamiento sistémico, y no la previa al tratamiento quirúrgico. Así el estudio SUCCESS-A¹²⁷ toma como referencia la detección previa al tratamiento adyuvante y los estudios REMAGUS2 y GeparQuattro la previa al tratamiento neoadyuvante.

Este estudio muestra que la detección prequirúrgica presenta una tasa de detección y un valor pronóstico equiparable a la toma en otros momentos del tratamiento. Este resultado es concordante con los escasos estudios en los que se realiza la muestra de referencia de CTC preoperatoriamente.^{124,125,129, 137}

En un reciente artículo holandés, Franken y colaboradores¹³⁷ presentan un estudio de detección de CTC en 602 pacientes previa a la cirugía. En él incluyen pacientes con tumores benignos, con carcinoma in situ y carcinomas estadíos I-III (CellSearch, 30ml). La tasa de detección de CTC ≥ 1 es del 15% en tumores benignos, 16% en estadio I, 18% en estadio II y 31% en estadio III. La tasa de detección en estadio I-II, que sería la comparable a la detección de CTC prequirúrgicas de nuestro estudio (CTC1), es menor que el 30,5% encontrada en nuestra muestra, a pesar de que utilizan una muestra de sangre 4 veces mayor. En el estudio de supervivencia presenta resultados concordantes a los de nuestro estudio, como analizaremos más adelante.

Nakagawa y colaboradores,¹²⁹ realizan también la toma de muestras antes de la cirugía, la detección de CTC es del 21% en estadio I del 45% estadio II y del 77% es

estadio III. Probablemente presenta una detección mayor que nuestro estudio por utilizar estudio genómico de 3 biomarcadores por RT-PCR, una técnica más compleja y no automatizada, pero más sensible. El uso de estas técnicas no automatizadas dificulta la reproducibilidad del estudio y la comparación de sus resultados. Nakagawa y colaboradores encuentran relación entre CTC positivas y metástasis ganglionar. No obstante, no describe estudio de supervivencia.

Los dos estudios ya mencionados de la MD Anderson^{124,125} que relacionan cáncer de mama precoz con CTC también realizan la toma de sangre en el momento previo a la cirugía, ambos coinciden con nuestro estudio en el porcentaje de detección de CTC y en la no relación de CTC con el resto de variables clínico-patológicas del tumor.

Por último, en un reciente meta-análisis, Zhang y colaboradores¹³⁸ estudian el diferente valor pronóstico de la detección de CTC según sea previa, durante o tras el tratamiento. Concluyen que los resultados son estables, no influenciados por el momento de la toma de la muestra, presentan similar valor pronóstico y sugieren que la presencia de CTC en diferentes momentos es un fuerte indicador pronóstico, no significativamente influenciado por la terapia sistémica. Sin embargo no estudian específicamente la relación de CTC con el tratamiento quirúrgico, probablemente por no encontrar en la revisión suficientes estudios que lo avalen.

La técnica de detección de CTC utilizada en el presente estudio fue el sistema estandarizado CellSearch.

Se han investigado diferentes métodos de detección de CTC: separación por gradiente de densidad y reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR) para identificar ARN mensajero citoqueratina 19,^{139,140} separación por gradiente de densidad con inmunotinción de citoqueratina,¹⁴¹ separación inmunomagnética y por gradiente de densidad con inmunotinción de citoqueratina,¹⁴² inmunotinción de HER2¹⁴³ o de mamoglobina¹⁴⁴, o detección molecular por reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa multimarcaador: citoqueratina19, mamoglobina y HER2¹⁴⁵.

Los dos métodos fundamentales en la actualidad son la inmunocitoquímica y la detección por RT-PCR. El número de estudios que utilizan uno u otro método es similar en la actualidad.¹³⁸ La ventaja principal de los métodos por inmunocitoquímica es la preservación de la célula durante el proceso, lo que permite futuros estudios de la misma por inmunocitoquímica o por técnicas moleculares.¹³⁸ Sin embargo los métodos por RT-PCR parecen ser más sensibles.¹⁴⁶ La heterogenicidad de las técnicas y los métodos de detección dificulta la comparación de los diferentes estudios.

La creación y aprobación de técnicas estandarizadas para la detección de CTC en sangre periférica ha permitido grandes avances en la investigación de estas células.

Existen comercializados 2 sistemas de detección de CTC, el AdnaGen (Langenhagen, Alemania), basado en la detección por RT-PCR¹⁴⁷ y el CellSearch, éste último, el utilizado en este estudio, está basado en inmunocitoquímica y en la actualidad es el único aprobado por la FDA para el uso clínico de la detección de CTC,¹³⁸ por el

momento únicamente en cáncer de mama metastático ya que no hay suficientes estudios para cáncer de mama no metastático.

Al comparar ambos métodos se encuentra una concordancia del 73% aunque el sistema *AdnaTest* demuestra una mayor tasa global de detección y permite la evaluación de marcadores genómicos en las CTC.¹⁴⁸

En cuanto al volumen de muestra de sangre, en nuestro estudio se protocolizaron 7,5ml de sangre periférica por muestra y paciente. Otros estudios de cáncer de mama precoz han estudiado volúmenes mayores, ya que la detección de CTC es menos frecuente y en menor cantidad que en cáncer de mama metastático, en cuyos estudios se utiliza fundamentalmente la muestra de 7,5ml. El estudio SUCCESS-A,¹²⁷ analiza 23ml de sangre en lugar de 7,5ml en cada extracción, sin embargo la tasa de detección de CTC (22% positivo, 9% 2 o más CTC) no es mayor sino que coincide con el resto de estudios y con el presente, el estudio Holandés de Franken¹³⁷ y colaboradores utilizan 4 veces la muestra estándar (30ml); en él la tasa de detección de CTC tampoco es mayor y el valor pronóstico de CTC es concordante con nuestro estudio. El volumen de 7,5ml aparece en nuestro estudio como suficiente para una detección válida y útil como factor pronóstico, el estudio de Lucci y colaboradores¹²⁵ presenta resultados semejantes con 7,5ml en las muestras. Probablemente la muestra de 7,5 ml sea más adecuada, esto facilitaría la estandarización de la prueba y comparación con detecciones en cáncer de mama metastático.

En el estudio de supervivencia de nuestro estudio, se ha realizado un seguimiento de 35 meses de media, durante los cuales han ocurrido 3 eventos, 1 recidiva locoregional y

2 pacientes con metástasis a distancia, las tres pacientes han presentado progresión de la enfermedad hasta muerte debido a cáncer.

Estos resultados concuerdan con las distribuciones halladas normalmente en estudios de supervivencia de cáncer no metastático de estadíos iniciales, con escasas recurrencias tempranas y picos de recurrencia a los 1-2 años independientemente de la terapia sistémica. Así, en el estudio de ECOG¹⁴⁹ en el que se realiza seguimiento de la recurrencia de 3585 pacientes con cáncer de mama operable tras su tratamiento, se describe un pico de recurrencia entre 1 y 2 años tras la cirugía que posteriormente desciende de 2 a 5 años y queda estable o en ligero descenso de 5 a los 12 años con un porcentaje de recurrencia de 5 a 12 años del 4,3 %, estas curvas difieren en todos los intervalos de tiempo según algunos factores pronósticos como el número de ganglios positivos.

De mismo modo, el grupo de Milán¹⁵⁰ realiza un estudio de seguimiento en 1173 pacientes tratadas con mastectomía y linfadenectomía sin terapia sistémica posterior, en el que encuentran un pico de riesgo a los 18 meses y otro a los 60 meses, seguido de un riesgo en meseta hasta los 15 años tanto para la recidiva locorregional como a distancia. Relaciona aumento de riesgo de recidiva temprana con tumores mayores de 2 cm, en cambio, el riesgo de recidiva tardía es independiente del tamaño tumoral. Los pacientes con ganglios positivos presentan picos de riesgo 4-5 veces mayores que aquellos con ganglios negativos en todos los intervalos de tiempo. El estudio propone una hipótesis de diferentes estados biológicos de las micrometástasis que influyen en el crecimiento de la metástasis y por tanto en el riesgo de recidiva en diferentes picos. Esta hipótesis avala los resultados de nuestro estudio.

La elección de pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales con N0 preoperatorio en nuestro estudio hace coherente los escasos eventos de recidiva y muerte. Por otro lado, la alta proporción de casos con receptores hormonales positivos en este estudio, acorde con la frecuencia habitual de cáncer con este tipo de clasificación inmunohistoquímica en la población con cáncer de mama general,¹⁵¹ hace que nuestra población tenga más tendencia a presentar recidivas a largo plazo, mayor al tiempo de seguimiento del estudio.

Al realizar el estudio de supervivencia, en el presente estudio se objetiva que la detección de CTC basales (CTC1), previas al tratamiento quirúrgico, es un factor independiente de mal pronóstico, se relaciona de manera estadísticamente significativa con mayor riesgo de supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad. La detección de CTC postquirúrgicas (CTC2) aparece con aumento de riesgo únicamente de supervivencia libre de enfermedad y únicamente si es igual o mayor a 2 células.

Entre el resto de factores pronóstico valorados, en el presente estudio se objetiva un incremento de riesgo a progresión de la enfermedad y de disminución de la supervivencia global estadísticamente significativa en los casos de receptores hormonales negativos y cáncer de mama subtipo triple negativo. Este resultado es coherente con el hecho de que presentar receptores hormonales negativos o cáncer tipo triple negativo son factores pronóstico conocidos, relacionados con menor supervivencia al menos en los primeros 15 años tras padecer el cáncer.³⁰ En los estudios de supervivencia en los que se detecta CTC en cáncer no metastásico, la relación del estado hormonal con la detección de CTC y de

ambas con la supervivencia es un hallazgo frecuente, como se describe más adelante.^{123,137,140,152}

En nuestro estudio, no se encuentra relación entre las características de las pacientes o el tipo de tratamiento quirúrgico con la supervivencia. Tampoco se encuentra relación estadísticamente significativa entre el riesgo de recidiva local, a distancia, ni supervivencia total con los factores pronóstico clásicos como tamaño tumoral, grado histológico ni estadio ganglionar. Esto probablemente se deba a que la muestra es muy homogénea en cuanto a estos factores pronóstico. Todas las pacientes presentaban cáncer de mama en estadios iniciales, con un tamaño tumoral menor de 2cm (T1) en el 70% de los casos y T2 el 30% restante, por lo que no existen grandes diferencias de masa tumoral. El estadio ganglionar es fundamental en la clasificación y pronóstico del cáncer de mama, sin embargo, en este estudio las pacientes se incluyeron sólo si no existía sospecha de afectación ganglionar, con indicación de biopsia de ganglio centinela. Sólo el 17% de la muestra presentó afectación ganglionar y, de éstas, sólo el 16% presentó metástasis mayores a 2mm, por lo que la afectación ganglionar es mínima en toda la muestra.

El análisis univariable mediante regresión de Cox, las variables significativa para supervivencia global y libre de enfermedad son la aparición de recidiva local o a distancia y la detección de CTC antes o después de la cirugía (CTC1+CTC2).

Finalmente, al realizar el análisis multivariante mediante el modelo de regresión de Cox, el riesgo relativo (RR) global para SG y SLE fue significativo únicamente para la variable CTC. Concretamente, el RR global para SG fue de 4,71 y para SLE de 5,05.

Es decir, en nuestro estudio, la detección de CTC pre o postquirúrgicamente es una variable significativa para la supervivencia, en pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos con N0 prequirúrgico, y la tasa de mortalidad y recidiva aumenta 4,71 y 5,05 veces respectivamente según aumenta el número de CTC detectada.

El estudio SUCCESS-A,^{123,127} como se comentaba en el inicio de la discusión, con un seguimiento de 35 meses y un reclutamiento de un gran número de pacientes, obtienen unos resultados en los que la presencia de CTC previa a tratamiento sistémico adyuvante y después de cirugía es predictor de supervivencia global y libre de enfermedad, con una importancia similar al tamaño tumoral, grado, afectación ganglionar y el estado hormonal. Este resultado debería compararse con el resultado de CTC2 (postquirúrgica) de nuestro estudio, el cual presenta una relación estadísticamente significativa de manera aislada únicamente con la supervivencia libre de enfermedad y no con supervivencia global, probablemente por presentar un número de pacientes inferior y estadios mucho mas tempranos de cáncer de mama. Sin embargo, si tenemos en cuenta los resultados prequirúrgicos (CTC1) o los totales (CTC1+CTC2), los resultados son concordantes en cuanto al valor pronóstico de CTC e incluso aparece con un valor predictivo mayor que el estadio ganglionar o el tamaño tumoral, probablemente debido a que la muestra presenta solo estadios precoces, con menor diferencia de tamaño tumoral y con escasa carga tumoral en las metástasis ganglionares.

El estudio SUCCESS-A además encuentra que el riesgo de recurrencia y muerte por cáncer se incrementa en relación con el número de CTC detectadas al comparar $CTC \geq 1$ y $CTC \geq 5$, con un riesgo relativo (RR) para SG y SLE de 1,91 y 1,88 para $CTC \geq 1$

y de 4,04 y 3,05 para $CTC \geq 5$. Estos resultados avalan el resultado del análisis multivariante de nuestro estudio en el que el riesgo de recurrencia y muerte por cáncer se incrementa en relación al número de CTC con un riesgo relativo global respecto a $CTC1+CTC2$ para SG de 4,71 y para SLE de 5,05, teniendo en cuenta que no se obtuvieron casos de $CTC \geq 5$.

El estudio de Franken y colaboradores¹³⁷ presenta detección de CTC previa a la cirugía en 602 pacientes. Tras 4 años de seguimiento concluyen que la presencia de CTC previas a la cirugía está asociada a la supervivencia libre de enfermedad a distancia pero no la supervivencia global y que las CTC, el estatus hormonal, y el estadio ganglionar son predictores de supervivencia global. Estos resultados concuerdan parcialmente con nuestro trabajo, que presenta mayor relación de supervivencia con CTC1, coincide en la relación con el estatus hormonal y no la relaciona con el estadio ganglionar, probablemente por presentar estadios más precoces, además este estudio no analiza la detección postquirúrgica de CTC.

Ignatidis¹⁴⁰ ha estudiado el diferente valor pronóstico de las CTC en relación con las diferentes variables clínico-patológicas del tumor primario. Encuentra, tras un seguimiento de 53 meses, que la detección de CTC previa a la quimioterapia adyuvante reduce la supervivencia global y libre de enfermedad, y observa que esta diferencia aparece principalmente en pacientes con receptores hormonales negativos, tipo basal o HER2 positivos. Este estudio presenta una proporción de pacientes triple negativos (17%) y HER2 positivos (19%), mayor que en nuestro estudio.

En otro estudio del mismo grupo, Ignatiadis¹⁴⁵ y colaboradores, encuentra una disminución de la supervivencia libre de enfermedad únicamente relacionado con la ausencia de receptores hormonales en el tumor primario y con la presencia de CTC (estudio por RT-PCR de CK19 mRNA+ y MB mRNA+) en 175 pacientes estadio I-III previamente a quimioterapia adyuvante.

Los resultados del grupo de Ignatidis son concordantes con los de nuestro estudio, en el que la detección de CTC1 se relaciona con la ausencia de receptores hormonales y, la aparición del factor “receptores hormonales negativos” y “triple negativo” como únicos factores pronóstico significativos junto a las CTC, sugiere que, como encuentra este autor en su estudio, la detección de CTC positivas pudiera tener relación con estos subtipos tumorales, aunque, por otro lado, estos subtipos tumorales son aquellos que presentan recidivas más tempranas y que por tanto habremos encontrado más frecuentemente en el tiempo de seguimiento realizado.

De acuerdo con el anterior, Hwang y colaboradores presentan la detección de CTC previa a la cirugía como indicador de mal pronóstico únicamente en pacientes con subtipos triple negativo y subtipo HER2neu de carcinoma de mama, en un estudio retrospectivo de 166 pacientes en el que no se encontró relación de CTC con ninguna otra característica clínico-patológica del tumor.¹⁵²

Lucci y colaboradores, encuentran relación estadísticamente significativa del hallazgo de 1 o más CTC en 302 pacientes estadio I-III con la recidiva y la supervivencia total tras un seguimiento de 35 meses.¹²⁵ Además presenta una relación cuantitativa en la

que números más altos de CTC presentan peor pronóstico con un Hazard Ratio pronóstico tan fuerte como la metástasis ganglionar. Presenta unos resultados concordantes con nuestro estudio. El tiempo de seguimiento es similar pero con una N mayor y, sobretodo, con una muestra con estadios más avanzados. La relación cuantitativa del pronóstico con el número de CTC encontrada también es concordante aunque no coincide en el riesgo relativo (RR) hallado en relación con la metástasis ganglionar, que en nuestro estudio no es significativo, probablemente por incluir únicamente estadios muy tempranos de cáncer de mama, con escasos casos de metástasis ganglionar.

Los resultados preliminares del estudio REMAGUS 02¹²⁶ informan de que la presencia de 1 o más CTC previas al comienzo de la quimioterapia es un predictor independiente de supervivencia total y libre de enfermedad, en un estudio realizado en 118 pacientes con estadios 2 y 3 de cáncer de mama que presenta, comparado con nuestro estudio, mayor tasa de recidivas, fundamentalmente debido al estadio mayor, con únicamente el 38% de casos libres de afectación ganglionar.

Por último, en el meta-análisis¹³⁸ realizado por Zhang y colaboradores, dirigido fundamentalmente a evaluar el valor pronóstico de la detección de CTC, analizan 49 estudios con un total de 6825 pacientes diagnosticados de cáncer de mama en cualquier estadio, concluye que la presencia de CTC esta asociado significativamente con peor pronóstico tanto en cáncer de mama metastático como temprano. Analizando la influencia del método de detección confirma que la presencia de CTC es un fuerte factor pronóstico tanto en el análisis por RT-PCR como por inmunocitoquímica.

Las guías clínicas de la ASCO (Sociedad Americana de Oncología Clínica) reconocen en la actualidad la utilidad de la detección de CTC en cáncer de mama metastático, por el momento no se recomienda su utilización para la estadificación de cáncer de mama no metastático. A pesar de ello, en la última edición de la American Joint Commission on Cancer Staging Manual¹⁵³ incluyen como nueva categoría la cM0(i+) para designar a aquellas pacientes con células circulantes en sangre o en médula ósea.

Este estudio apoya la idea de la utilización de CTC en los algoritmos de cáncer no metastático ya que aporta información del posible proceso metastático y es un potente factor pronóstico. Es más, los resultados de este estudio muestran que la detección de CTC podría ser útil en estadios iniciales del cáncer de mama, en los que, a pesar de un aparente buen pronóstico si se tienen en cuenta los factores pronóstico clásicos, existe un porcentaje de pacientes que presentará progresión de la enfermedad.

II. ESTUDIO MOLECULAR DEL GANGLIO CENTINELA

La técnica de ganglio centinela es la aceptada en la actualidad como más adecuada en el estudio axilar en el cáncer de mama. Su diagnóstico de manera intraoperatoria requiere un análisis rápido y sensible para no alargar tiempos quirúrgicos y, a la vez, para no precisar de reintervenciones por resultados falsos negativos.

El primer método y el “patrón oro” diagnóstico en el análisis del ganglio centinela es el estudio histológico. Sin embargo no existe una técnica estandarizada para este análisis; su resultado varía en función del número de secciones del ganglio, de la experiencia del patólogo y de la tinción utilizada. El intento de mejorar el diagnóstico de metástasis en el ganglio centinela ha llevado al estudio de diferentes técnicas que complementen o sustituyan el estudio clásico.

En nuestro estudio se realizó el análisis del ganglio centinela mediante PCR en secciones de los mismos, a la vez que se llevaba a cabo el análisis histológico del resto de secciones de cada ganglio. Se valoró la relación con los resultados del estudio histológico o estudio de referencia, la relación con los factores pronósticos y la relación con la supervivencia.

En el Hospital clínico San Carlos se realiza, por protocolo, análisis intraoperatorio de ganglio centinela mediante tinción con hematoxilina-eosina de cortes congelados, y, por

tanto, así se llevó a cabo en todas las pacientes de nuestro estudio. Esta técnica ha demostrado alta especificidad (99-100%) y moderada sensibilidad (57-74%) con respecto al estudio diferido.¹⁵⁴

Otra técnica de estudio intraoperatorio clásica es la tinción de impronta citológica, las tinciones más utilizadas para el estudio citológico son Hematoxilina-Eosina, con un intervalo de sensibilidad en los estudios de 41-96% y Papanicolau con un intervalo de sensibilidad de 62-91%. Presenta como ventaja que no hay pérdida del tejido de la muestra al estudiarlo y es muy rápido (20-30 minutos) pero no está estandarizada, es muy subjetiva, no puede medir el tamaño de la metástasis y baja su sensibilidad en el carcinoma lobulillar.¹⁵⁵

Una línea de estudio para mejorar la técnica de ganglio centinela es mediante inmunohistoquímica del ganglio centinela. Fujisima¹⁵⁶ y colaboradores comparan el estudio citológico intraoperatorio del ganglio centinela mediante Papanicolau solo o con Papanicolau asociado a inmunohistoquímica, obteniendo una sensibilidad/ especificidad de 30%/99% y 79%/99% respectivamente. Concluyen que el estudio citológico de ganglio centinela debe hacerse siempre por patólogos experimentados, y, siempre que sea posible, asociado a técnicas de inmunohistoquímica.

Clarke¹⁵⁷ y colaboradores analizan técnicas de inmunohistoquímica ultrarrápidas asociado a las tinciones citológicas y la realización de secciones más pequeñas en el ganglio centinela, obteniendo una precisión del 89% respecto al estudio diferido.

Las técnicas de inmunohistoquímica muestran una sensibilidad similar a las técnicas clásicas, con un aumento de falsos positivos que implican la realización de linfadenectomías innecesarias, han demostrado mejorar la sensibilidad de la biopsia de ganglio centinela únicamente en combinación con el estudio histológico y no como técnica única.¹⁵⁸

La otra línea de estudio para mejorar la técnica de ganglio centinela es la realizada en nuestro estudio, consiste en amplificación de genes propios de células epiteliales, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Estos genes sólo aparecen en el tejido ganglionar si hay células que han migrado desde el tejido mamario.

Inicialmente se estudió cuáles podrían ser los marcadores moleculares más adecuados para identificar metástasis. Schoenfeld⁵² y colaboradores describieron en 1994 que la citoqueratina 19 era un buen discriminador entre ganglio con y sin metástasis, con mayor sensibilidad que la inmunohistoquímica. Desde entonces, otros estudios han corroborado estos resultados y la CK19 es en la actualidad el marcador más utilizado para el estudio molecular de ganglio centinela.

Posteriormente se estudiaron las diferentes combinaciones de marcadores para mejorar la sensibilidad y especificidad de la técnica; diversos estudios demuestran que la detección de varios genes complementarios aumenta la sensibilidad de la técnica debido a la heterogeneidad del cáncer de mama⁵³.

Nuestro estudio incluye la RT-PCR para los genes de citokeratina 19 y de mamoglobina. Los resultados fueron positivos en 5 pacientes (8,3%) para Citoqueratina19 y en 6 pacientes (10 %) para mamoglobina. En total, 7 pacientes de la muestra (11,7%) presentaron metástasis en el ganglio centinela mediante detección por PCR de MG y CK19, menos que las 10 pacientes detectadas por el método histológico.

El 96% de las pacientes con biopsia de ganglio centinela negativo para malignidad presentaron también negatividad en el análisis de ganglio centinela por PCR (48 de 50 pacientes). Se presentaron 2 casos (4%) en los que la BGC fue negativa y, sin embargo, presentaron positividad para metástasis en ganglio centinela por PCR (MG o CK19). De entre las pacientes con hallazgo de metástasis en el ganglio centinela por análisis clásico (10 pacientes), tan solo 5 de ellas (50%) presentaron positividad por PCR. $P=0,001$.

Manzotti y colaboradores⁵³ analizan 5 marcadores génicos y estudian histológicamente los ganglios centinela de 123 pacientes. Analizados por separado, ninguno de los marcadores presentó mayor sensibilidad de 78%, con una concordancia máxima de 83%, con respecto al estudio histológico. Sin embargo esta concordancia mejoraba si se tenían en cuenta varios marcadores, y llegaba al 88% si se consideraba como positivo presentar 2 marcadores de los estudiados. Analizados por separado, el marcador con mejores resultados era la Mamoglobina, que presentaba una sensibilidad del 78% y especificidad del 86%.

Verbanac y colaboradores¹⁵⁹ realizan un estudio prospectivo multicéntrico de largo seguimiento en el que se incluyen 547 pacientes con cáncer de mama a las que se analiza el

ganglio centinela por hematoxilina-eosina y por detección de Mamoglobina por RT-PCR en secciones alternas de 2mm. Sus resultados informan de que la mamoglobina es un marcador con alta sensibilidad y especificidad, asociado a otros factores pronósticos y a disminución supervivencia libre de enfermedad.

En un estudio prospectivo, el equipo alemán de Wallwiener y colaboradores,¹⁶⁰ analizan el estudio del ganglio centinela comparando los resultados de un solo marcador, de varios marcadores moleculares y de los obtenidos a través del método histológico tradicional. Incluye la detección por RT-PCR de Citoqueratina 19, mamoglobina 1, mamoglobina 2, EpCAM (*Epithelial cell adhesion molecule*), CEA (Antígeno carcinoembrionario) y NY-BR-1(*differentiation antigen-breast cancer*). Tras estudiar la sensibilidad y especificidad de cada marcador y sus combinaciones, concluyen que el grupo óptimo comprende 4 marcadores: CK19, MGB1, EpCAM y NY-BR-1. Cuando considera positivos los casos en los que se detecta la presencia de dos o más de estos marcadores, obtiene un 95% de sensibilidad, 95% de especificidad, 85% de valor predictivo positivo y 98,7% de valor predictivo negativo, con una concordancia total del 95%. La sensibilidad/especificidad individual para CK19 fue 94,6%/97,9% y para mamoglobina 82,4%/91,1%. Concluyen que el estudio molecular es un complemento útil para el diagnóstico del ganglio centinela en pacientes con cáncer de mama y que la detección multi-paramétrica no demuestra mayor precisión diagnóstica con respecto la detección de un solo marcador.

Nuestro estudio presenta sensibilidad/especificidad individual para Mamoglobina del 50%/98% y para CK19 del 40%/98%, el análisis de ambas presenta una

sensibilidad/especificidad del 50%/96%, datos de alta especificidad pero con menor sensibilidad que los estudios presentados. El estudio de varios marcadores no demuestra mayor precisión diagnóstica respecto a la detección de un solo marcador génico tampoco en nuestro estudio, por lo que en general bastaría con el estudio de uno de ellos.

Posiblemente la menor sensibilidad en nuestro estudio se deba a que se estudiaron sólo secciones de los ganglios centinela, en los cuales en la mayoría de los casos las metástasis ganglionares eran de pequeño tamaño, como pudo comprobarse en el análisis diferido (media 6,8mm), por lo que puede ser que las secciones remitidas para el estudio molecular presentaran con menos frecuencia áreas con afectación tumoral. Una de las ventajas fundamentales que se describen de las técnicas moleculares es la homogenización del ganglio para el estudio intraoperatorio de todo el tejido ganglionar; en este estudio, sin embargo, sólo se ha utilizado parte de este tejido.

Los problemas que presenta la técnica por RT-PCR era el tiempo precisado para el estudio y la cuantificación de masa tumoral. Julian y colaboradores¹⁶¹ desarrollaron en 2008 la validación de la técnica automatizada de RT-PCR de CK19 y Mamoglobina a tiempo real para el ganglio centinela, (*Breast Lymph Node Assay*) recogiendo un tamaño muestral de 416 pacientes en un estudio multicéntrico. Los parámetros de sensibilidad y especificidad fueron de 87% y 94% respectivamente, datos más elevados que en nuestro estudio. Con un tiempo estimado de 35-46 minutos para analizar de uno a tres ganglios. Se han realizado otros ensayos de validación de esta técnica con resultados similares en precisión y ha sido aprobada para su comercialización y uso en la clínica por la FDA, sin

embargo, en Diciembre de 2009 fue retirado del mercado, no por su falta de precisión sino por decisión de la empresa que lo comercializaba.^{162,163}

Basado en la amplificación del mRNA de gen de Citoqueratina 19 a tiempo real, se ha desarrollado también el método OSNA (One Step Nucleic Acid Amplification), con amplificación isotérmica RT-LAMP (reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification). Comparado con el estudio histológico obtiene unos valores de sensibilidad de 87,5-98% y especificidad de 90,8-94,3%.^{164,165,166} Es un método automatizado y estandarizado, que permite el análisis intraoperatorio del ganglio centinela con alta precisión.

La técnica OSNA tenía inicialmente el punto débil de que se utilizaba todo el ganglio para su análisis, realizando la comparación con controles y no con el mismo ganglio. Sin embargo, en los últimos estudios, como el de Tamaki y colaboradores¹⁶⁶, comparan los resultados con una pequeña sección central del mismo ganglio, repartiendo el material en ambas técnicas, como se ha realizado nuestro estudio. El resultado es igualmente satisfactorio. Es decir, es una técnica objetiva y rápida que permite mejorar la biopsia de ganglio centinela.

Otro problema que presenta la detección de CK19 como único marcador son los tumores citoqueratina 19 negativos, que se subsana analizando la presencia del mismo durante el diagnóstico histológico inicial del cáncer en el momento de la biopsia prequirúrgica. La detección de CK19 en ganglio centinela mediante RT-PCR, incluida la

técnica OSNA, no es válida en los tumores sin detección de CK19 en la biopsia diagnóstica.

En nuestro estudio se presentan 2 casos en los que la biopsia de ganglio centinela es negativo por la técnica habitual y positivo por técnica molecular (mamoglobina o citoqueratina 19); no se encontraron diferencias en la supervivencia libre de enfermedad ni global entre estas pacientes y las que presentaron biopsia de ganglio centinela negativo por las dos técnicas.

En el estudio de RT-PCR de Verbanac y colaboradores,¹⁵⁹ las pacientes con ganglio centinela negativo por la técnica habitual pero mamoglobina positiva, presentaron menor supervivencia libre de enfermedad que aquellas con ganglio centinela negativo por las dos técnicas. Sin embargo, este estudio molecular no predijo la mayoría de las recurrencias en pacientes N0 ni aparece como predictor de recurrencia a distancia. Aun así, concluyen que el estudio molecular detecta enfermedad clínicamente significativa no detectada por la técnica habitual.

En un estudio previo realizado en nuestro centro, el Hospital Clínico San Carlos, se estudió también la relación entre la detección de MG y CK19 con el análisis histológico del ganglio centinela, se obtuvo una sensibilidad de 66,6% y una especificidad del 87,2% y se encontraron mejores tasas de supervivencia en las pacientes con resultado negativo de MG y CK19 que aquellas con resultado positivo en dicha prueba.^{167,168}

Otros estudios niegan esta mejoría en la predicción de supervivencia. Fischer y colaboradores, comparan el estudio histológico con la detección por RT-PCR a tiempo real

de múltiples marcadores, incluyendo CK19 y MG, con un seguimiento a 5 años, tras el cual no objetivan peor pronóstico en aquellas pacientes que presentaban marcadores positivos sin afectación según el estudio histológico.¹⁶⁹

La detección de MG y CK19 por RT-PCR presenta, por tanto, precisión suficiente para la biopsia de ganglio centinela, aunque no demuestra mejor precisión que la técnica clásica en nuestro estudio.

Existen controversias en la utilización de estas técnicas como único estudio del ganglio centinela. Una de ellas es la pérdida del estudio morfológico del ganglio: la extensión extranodal de la metástasis o el posible acúmulo de múltiples depósitos menores de 0,2mm, que se interpretan como ganglio positivo, son algunos de los datos que no se obtienen en el estudio molecular.

Otra controversia es la posibilidad de detectar células epiteliales no tumorales en el ganglio centinela, que se interpretarían como ganglio centinela positivo. Esto se debe a que la mamoglobina y citoqueratina19 son marcadores de célula epitelial, no específicos de célula tumoral y a que puede existir migración de células mamarias durante la manipulación del cáncer.¹⁷⁰

El análisis cuantitativo de la carga tumoral en ganglio centinela permite descartar en parte estas controversias ya que un punto de corte suficientemente alto descartaría a los ganglios con células tumorales aisladas o con desplazamiento iatrogénico de células epiteliales.

Por último, se podría considerar que el análisis molecular del ganglio centinela es demasiado sensible. Los avances en las técnicas que mejoran la sensibilidad de detección de metástasis ganglionar tienen menos sentido a medida que aparecen nuevos estudios en los que el papel de la linfadenectomía se pone en duda, como en casos de micrometástasis^{171,172} o incluso en casos de ganglio centinela positivo en casos seleccionados y con 2 o menos ganglios afectados.⁴⁶ A este respecto se debe tener en cuenta que la linfadenectomía cada vez tiene menos indicaciones, pero que el conocimiento del estado ganglionar continúa siendo fundamental para la indicación de terapia sistémica y el dictamen pronóstico.

A pesar de que las guías americanas mantienen como referencia el estudio de ganglio centinela por el método de hematoxilina-eosina y la clasificación TNM no cambia con hallazgos moleculares que no se detectan por la técnica clásica, las técnicas moleculares estandarizadas han demostrado presentar sensibilidad y especificidad equiparables a método clásico, con la ventaja de la estandarización de la prueba. Siempre y cuando puedan distinguir la carga tumoral, para discernir células aisladas, micro y macrometástasis.¹⁷³

Por ello, la Sociedad Española de Senología y Patología mamaria recomienda en la actualización del consenso para ganglio centinela de 2010 una técnica cuantitativa de análisis por amplificación de mRNA que, al cuantificar carga tumoral, puede clasificar el ganglio en pN0 (mol+), pN1mic (mol) o pN1 (mol).³⁴

El manejo molecular mediante PCR intraoperatorio permite estandarizar la técnica, evitando la dependencia intraobservador/interobservador y obteniendo intervalos de sensibilidad y especificidad comparables al “patrón oro”, además no se ve influida por el número de cortes del ganglio.¹⁶³

CONCLUSIONES

1. En nuestro estudio, la detección de Células Tumorales Circulantes es un factor pronóstico independiente, en pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales, sin afectación ganglionar clínica prequirúrgica.
2. No se encuentra correlación estadística de la determinación de CTC con el estado ganglionar definitivo, diagnosticado mediante biopsia selectiva de ganglio centinela, ni con ningún otro factor pronóstico estudiado.
3. El estudio molecular del ganglio centinela mediante RT-PCR de Citoqueratina 19 y Mamoglobina presenta alta concordancia con el estudio histológico del mismo y tiene el potencial de ser un método más objetivo y reproducible para identificar ganglios centinela con presencia de metástasis.
4. Se objetiva un incremento de riesgo a progresión de la enfermedad y de disminución de la supervivencia global estadísticamente significativa en los casos de receptores hormonales negativos y cáncer de mama subtipo triple negativo. No se objetiva relación de la supervivencia con el estado de ganglio centinela ni con otros factores pronóstico.
5. No existe evidencia de que la cirugía aumente la diseminación de Células Tumorales Circulantes.
6. En cáncer de mama en estadio precoz, la detección de 1 CTC es válida como referencia en relación al pronóstico y no precisa un punto de corte mayor.

7. Este estudio apoya la utilización de CTC en los algoritmos de cáncer no metastático ya que aporta información del posible proceso metastático y es un potente factor pronóstico. Es necesario realizar estudios más amplios para demostrar, de manera concluyente su utilidad en la clínica diaria.

BIBLIOGRAFÍA

-
- 1 Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61:69.
 - 2 La situación del Cáncer en España 1975-2006. Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto Carlos III. www.isciii.es.
 - 3 Pollán M, Pastor-Barriuso R, Ardanaz E, Argüelles M, Martos C, Galcerán J, Sánchez-Pérez MJ, Chirlaque MD, Larrañaga N, Martínez-Cobo R, Tobalina MC, Vidal E, Marcos-Gragera R, Mateos A, Garau I, Rojas-Martín MD, Jiménez R, Torrella-Ramos A, Perucha J, Pérez-de-Rada ME, González S, Rabanaque MJ, Borràs J, Navarro C, Hernández E, Izquierdo A, López-Abente G, Martínez C. Recent changes in breast cancer incidence in Spain, 1980-2004. *J Natl Cancer Inst*. 2009 Nov 18;101(22):1584-91.
 - 4 Costanza ME, Chen WY. Epidemiology and risk factors for breast cancer, Up to Date. Last literature review version 18.3: septiembre 2012.
 - 5 López-Jurado CF, Martínez-Sánchez JM, Anes del Amo Y, Ramos-Aceitero JM. Mortalidad y frecuencia hospitalaria de tumor maligno de mama en Extremadura (2002-2004). *Enferm Clin*. 2008;18:296-301.
 - 6 Hsieh CC, Trichopoulos D, Katsouyanni K, Yuasa S. Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *Int J Cancer* 1990; 46:796.
 - 7 Brinton L., Schairer C, Hoover R., Fraumeni J. F. Menstrual factors and risk of breast cancer. *Cancer Invest.*, 1988; 6:245-254.
 - 8 Macmahon B, Cole P, Lin T.M. et al. Age at first birth and breast cancer risk. *Bull World Health Organ*, 1970; 43:209-217.
 - 9 Rosner B, Colditz GA, Willett WC. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* 1994; 139:819.
 - 10 Colditz, GA, Rosner, B. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* 2000; 152:950.
 - 11 Vatten L, Kvinnsland S. Pregnancy-related factors and risk of breast cancer in a prospective study of 29.981 Norwegian women. *Eur. J. Cancer*, 1992; 28:1148-1153.
 - 13 Martin RM, Middleton N, Gunnell D, et al. Breast-feeding and cancer: the Boyd Orr cohort and a systematic review with meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97:1446.
 - 14 Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet* 2002; 360:187.

15 Marchbanks PA, McDonald JA, Wilson HG, Folger SG, Mandel MG, Daling JR, Bernstein L, Malone KE, Ursin G, Strom BL, Norman SA, Wingo PA, Burkman RT, Berlin JA, Simon MS, Spirtas R, Weiss LK. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *N Engl J Med*. 2002; 346(26):2025.

16 Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002 Jul 17; 288(3):321-33.

17 Calle EE, Feigelson HS, Hildebrand JS et al. Postmenopausal hormone use and breast cancer associations differ by hormone regimen and histologic subtype. *Cancer* 2009; 115:936.

18 Degnim AC, Visscher DW, Berman HK et al. Stratification of breast cancer risk in women with atypia: a Mayo cohort study. *J Clin Oncol* 2007; 25:2671.

19 Landis S H, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1998. *CA Cancer J. Clin.*, 1998; 48:6-29

20 Sieri, S, Krogh V, Ferrari P et al. Dietary fat and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr* 2008; 88:1304.

21 Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* 2001; 358:1389.

22 Li CI, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer* 2005; 93:1046.

23 Winchester DJ, Chang HR, Graves TA, et al. A comparative analysis of lobular and ductal carcinoma of the breast: presentation, treatment, and outcomes. *J Am Coll Surg* 1998; 186:416

24 Orvieto E, Maiorano E, Bottiglieri L, et al. Clinicopathologic characteristics of invasive lobular carcinoma of the breast: results of an analysis of 530 cases from a single institution. *Cancer* 2008; 113:1511.

25 Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406:747.

26 Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, et al. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Ann Oncol* 2007; 18:1133.

- 27 Clarke M, Collins R, Darby S, et al. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 366:2087.
- 28 Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Bauer M, Wolmark N, Wickerham DL, Deutsch M, Montague E, Margolese R, Foster R. Ten-year results of a randomized clinical trial comparing radical mastectomy and total mastectomy with or without radiation. *N Engl J Med*. 1985 Mar 14;312(11):674-81.
- 29 Bland KI, Scott-Conner CE, Menck H, Winchester DP. Axillary dissection in breast-conserving surgery for stage I and II breast cancer: a National Cancer Data Base study of patterns of omission and implications for survival. *J Am Coll Surg*. 1999;188(6):586.
- 30 Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:966
- 31 Mansel RE, Fallowfield L, Kissin M, et al. Randomized multicenter trial of sentinel node biopsy versus standard axillary treatment in operable breast cancer: the ALMANAC Trial. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98:599.
- 32 Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23:7703.
- 33 Veronesi U, Viale G, Paganelli G et al. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: ten-year results of a randomized controlled study. *Ann Surg* 2010; 251:595.
- 34 Bernet L, Piñero A, Vidal-Sicart S, Cano R, Cordero JM et al. Actualización del consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. *Rev Senlogi Patol Mam* 2010; 23 (5), PP. 201-208.
- 35 Andersson Y, Frisell J, Sylvan M, de Boniface J, Bergkvist L. Breast cancer survival in relation to the metastatic tumor burden in axillary lymph nodes. *J Clin Oncol*. 2010 Jun 10;28(17):2868-73.
- 36 Reed J, Rosman M, Verbanac KM et al. Prognostic implications of isolated tumor cells and micrometastases in sentinel nodes of patients with invasive breast cancer: 10-year analysis of patients enrolled in the prospective East Carolina University/Anne Arundel Medical Center Sentinel Node Multicenter Study. *J Am Coll Surg* 2009; 208:333.
- 37 Gobardhan PD, Elias SG, Madsen EV, et al. Prognostic value of micrometastases in sentinel lymph nodes of patients with breast carcinoma: a cohort study. *Ann Oncol* 2009; 20:41.

38 Francissen CM, Dings PJ, van Dalen T, Strobbe LJ, van Laarhoven HW, de Wilt JH. Axillary recurrence after a tumor-positive sentinel lymph node biopsy without axillary treatment: a review of the literature. *Ann Surg Oncol*. 2012 Dec; 19(13):4140-9.

39 National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines www.nccn.org.

40 Turner RR, Chu KU, Qi K et al. Pathologic features associated with non-sentinel lymph node metastases in patients with metastatic breast carcinoma in a sentinel lymph node. *Cancer* 2000; 89:574.

41 Fant JS, Grant MD, Knox SM et al. Preliminary outcome analysis in patients with breast cancer and a positive sentinel lymph node who declined axillary dissection. *Ann Surg Oncol* 2003; 10:126.

42 Jeruss JS, Winchester DJ, Sener SF et al. Axillary recurrence after sentinel node biopsy. *Ann Surg Oncol* 2005; 12:34.

43 Hwang RF, Gonzalez-Angulo AM, Yi M et al. Low locoregional failure rates in selected breast cancer patients with tumor-positive sentinel lymph nodes who do not undergo completion axillary dissection. *Cancer* 2007; 110:723.

44 Chagpar AB. Clinical significance of minimal sentinel node involvement and management options. *Surg Oncol Clin N Am* 2010; 19:493.

45 Gur AS, Unal B, Johnson R et al. Predictive probability of four different breast cancer nomograms for nonsentinel axillary lymph node metastasis in positive sentinel node biopsy. *J Am Coll Surg* 2009; 208:229.

46 Giuliano AE, McCall L, Beitsch P et al. Locoregional recurrence after sentinel lymph node dissection with or without axillary dissection in patients with sentinel lymph node metastases: the American College of Surgeons Oncology Group Z0011 randomized trial. *Ann Surg* 2010; 252:426.

47 Straver ME, Meijnen P, van Tienhoven G et al. Sentinel node identification rate and nodal involvement in the EORTC 10981-22023 AMAROS trial. *Ann Surg Oncol* 2010; 17:1854.

48 Galimberti V. International Breast Cancer Study Group Trial of sentinel node biopsy. *J Clin Oncol* 2006; 24:210.

49 Leitch AM, Beitsch PD, McCall LM, Posther K, Newman LA, Herndon JE 2nd, Hunt KK, Giuliano AE. Patterns of participation and successful patient recruitment to American College of Surgeons Oncology Group Z0010, a phase II trial for patients with early-stage breast cancer. *Am J Surg*. 2005 Oct;190(4):539-42.

50 Rydén L, Chebil G, Sjöström L, Pawlowski R, Jönsson PE. Determination of sentinel lymph node (SLN) status in primary breast cancer by prospective use of

immunohistochemistry increases the rate of micrometastases and isolated tumour cells: analysis of 174 patients after SLN biopsy. *Eur J Surg Oncol*. 2007 Feb; 33(1):33-8.

51 Hunt KK, Ballman KV, McCall LM, Boughey JC, Mittendorf EA, Cox CE, Whitworth PW, Beitsch PD, Leitch AM, Buchholz TA, Morrow MA, Giuliano AE. Factors associated with local-regional recurrence after a negative sentinel node dissection: results of the ACOSOG Z0010 trial. *Ann Surg*. 2012 Sep;256(3):428-36.

52 Schoenfeld A, Luqmani Y, Smith D, O'Reilly S, Shousha S, Sinnett HD, Coombes RC. Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by using polymerase chain reaction. *Cancer Res*. 1994 Jun 1;54(11):2986-90.

53 Manzotti M, Dell'Orto P, Maisonneuve P, Zurrida S, Mazzarol G, Viale G. Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for multiple mRNA markers in the detection of breast cancer metastases in sentinel lymph nodes. *Int J Cancer*. 2001 Sep 20;95(5):307-12.

54 Yun K, Gunn J, Merrie AE, Phillips LV, McCall JL. Keratin 19 mRNA is detectable by RT-PCR in lymph nodes of patients without breast cancer. *Br J Cancer*. 1997;76(8):1112-3.

55 Inokuchi M, Ninomiya I, Tsugawa K, Terada I, Miwa K. Quantitative evaluation of metastases in axillary lymph nodes of breast cancer. *Br J Cancer*. 2003 Nov 3;89(9):1750-6.

56 Mikhitarian K, Martin RH, Mitas M, Mauldin PD, Palesch Y, Metcalf JS, Cole DJ, Gillanders WE. Molecular analysis improves sensitivity of breast sentinel lymph node biopsy: results of a multi-institutional prospective cohort study. *Surgery*. 2005 Sep;138(3):474-81.

57 Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F, Kato Y, Tsuda H, Ueda S, Sato K, Tamaki Y, Noguchi S, Kataoka TR, Nakajima H, Komoike Y, Inaji H, Tsugawa K, Suzuki K, Nakamura S, Daitoh M, Otomo Y, Matsuura N. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2007 Aug 15;13(16):4807-16.

58 Feldman S, Krishnamurthy S, Gillanders W, Gittleman M, Beitsch PD, Young PR, Streck CJ, Whitworth PW, Levine EA, Boolbol S, Han LK, Hermann R, Hoon DS, Giuliano AE, Meric-Bernstam F; US One Step Nucleic Acid Amplification Clinical Study Group. A novel automated assay for the rapid identification of metastatic breast carcinoma in sentinel lymph nodes. *Cancer*. 2011 Jun 15;117(12):2599-607.

59 Viale G, Dell'Orto P, Biasi MO, et al. Comparative evaluation of an extensive histopathologic examination and a real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction assay for mammaglobin and cytokeratin 19 on axillary sentinel lymph nodes of breast carcinoma patients. *Ann Surg* 2008; 247:136.

60 Baranzelli MC, Penault-Llorca F, Revillon F, Portefaix G, Mishellany F, Chauvet MP, Giard S. Intraoperative determination of axillary node metastasis by RT-PCR. *Bull Cancer*. 2010 Mar;97(3):349-55.

61 Sakorafas GH, Geraghty J, Pavlakis G. The clinical significance of axillary lymph node micrometastases in breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2004 Oct; 30(8):807-16.

62 Harris JR, Halpin-Murphy P, McNeese M et al. Consensus Statement on postmastectomy radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 44:989.

63 Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 365:1687.

64 Winer EP, Hudis C, Burstein HJ et al. American Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: status report 2004. *J Clin Oncol* 2005; 23:619.

65 Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol* 2009; 20:1319.

66 Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Láng I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Rüschoff J, Suto T, Gøtzsche V, Ward C, Straehle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD; Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005 Oct 20;353(16):1659-72.

67 Robert N, Leyland-Jones B, Asmar L, Belt R, Illegodu D, Loesch D, Raju R, Valentine E, Sayre R, Cobleigh M, Albain K, McCullough C, Fuchs L, Slamon D. Randomized phase III study of trastuzumab, paclitaxel, and carboplatin compared with trastuzumab and paclitaxel in women with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Jun 20; 24(18):2786-92.

68 NIH consensus conference. Treatment of early-stage breast cancer. *JAMA* 1991; 265:391.

69 Page DL. Prognosis and breast cancer. Recognition of lethal and favorable prognostic types. *Am J Surg Pathol* 1991; 15:334.

70 Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 1993; 11:2090.

- 71 Harris, L, Fritsche H, Mennel R et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:5287.
- 72 Berry DA, Cirincione C, Henderson IC et al. Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer. *JAMA* 2006; 295:1658.
- 73 Grann VR, Troxel AB, Zojwalla NJ et al. Hormone receptor status and survival in a population-based cohort of patients with breast carcinoma. *Cancer* 2005; 103:2241.
- 74 Taucher S, Rudas M, Mader RM, et al. Do we need HER-2/neu testing for all patients with primary breast carcinoma? *Cancer* 2003; 98:2547.
- 75 Kröger N, Milde-Langosch K, Riethdorf S, et al. Prognostic and predictive effects of immunohistochemical factors in high-risk primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006; 12:159.
- 76 de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer* 2007; 96:1504.
- 77 Guerra JA, Moreno F. Guía clínica del diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama 2007. Sociedad Española de Oncología Médica.
- 78 Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol*. 2010;11(2):174.
- 79 Pharoah PD, Day NE, Caldas C. Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 1999; 80:1968.
- 80 Bergh J, Norberg T, Sjögren S et al. Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nat Med* 1995; 1:1029.
- 81 Weidner N, Folkman J, Pozza F et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84:1875.
- 82 Ludovini V, Sidoni A, Pistola L et al. Evaluation of the prognostic role of vascular endothelial growth factor and microvessel density in stages I and II breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 81:159.
- 83 Foekens JA, Look MP, Bolt-de Vries J et al. Cathepsin-D in primary breast cancer: prognostic evaluation involving 2810 patients. *Br J Cancer* 1999; 79:300.

- 84 Billgren AM, Tani E, Liedberg A et al. Prognostic significance of tumor cell proliferation analyzed in fine needle aspirates from primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 71:161.
- 85 Look MP, van Putten WL, Duffy MJ et al. Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:116.
- 86 Harbeck N, Kates RE, Schmitt M. Clinical relevance of invasion factors urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 for individualized therapy decisions in primary breast cancer is greatest when used in combination. *J Clin Oncol* 2002; 20:1000.
- 87 Martín A, Corte MD, Alvarez AM et al. Prognostic value of pre-operative serum CA 15.3 levels in breast cancer. *Anticancer Res* 2006; 26:3965.
- 88 Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ and Panel members†. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009. *Ann Oncol*. 2009 August; 20(8): 1319–1329.
- 89 Wittner BS, Sgroi DC, Ryan PD, et al. Analysis of the MammaPrint breast cancer assay in a predominantly postmenopausal cohort. *Clin Cancer Res* 2008; 14:2988.
- 90 Information on the MINDACT trial available online at www.eortc.be/services/unit/mindact/default.asp.
- 91 Espinosa E, Vara JA, Redondo A, et al. Breast cancer prognosis determined by gene expression profiling: a quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction study. *J Clin Oncol* 2005; 23:7278.
- 92 Goncalves R, Bose R. Using multigene tests to select treatment for early-stage breast cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2013 Feb 1;11(2):174-82.
- 93 Braun S, Pantel K, Müller P, et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000; 342:525.
- 94 Mansi JL, Gogas H, Bliss JM et al. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. *Lancet* 1999; 354:197.
- 95 Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351:781.
- 96 Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23:1420.

-
- 97 Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT et al. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res* 2006; 12:4218.
- 98 Giordano A, Cristofanilli M. CTC in metastatic breast cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2012;195:193-201.
- 99 Smerage, JB, Hayes, DF. The measurement and therapeutic implications of circulating tumour cells in breast cancer. *Br J Cancer* 2006; 94:8.
- 100 Martin M, Custodio S, Maestro ML, Garcia Saenz J. A, De la Torre J, Bellon Cano J. M, López Tarruela S, Vidaurreta M, De la Orden V, Jerez Y, Márquez Rodas I, Casado A, Sastre J, Diaz Rubio E. Circulating tumor cells after first chemotherapy cycle: an early and strong predictor of outcome in patients with metastatic breast cancer. *En prensa.*
- 101 Budd GT, Cristofanilli M, Ellis M, et al. Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12:6403.
- 102 García-Sáenz JA, Martín M, Maestro ML, Vidaurreta M, Veganzones S, Rafael S, Casado A, Bobokova J, Sastre J, De la Orden V, Arroyo M, Díaz-Rubio E. Circulating tumour cells in locally advanced breast cancer. *Clin Transl Oncol.* 2009 Aug;11(8):544-7.
- 103 Riethdorf S, Müller V, Zhang L, Rau T, Loibl S, Komor M, Roller M, Huober J, Fehm T, Schrader I, Hilfrich J, Holms F, Tesch H, Eidtmann H, Untch M, von Minckwitz G, Pantel K. Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial. *Clin Cancer Res.* 2010 May 1;16(9):2634-45.
- 104 Pierga JY, Bidard FC, Mathiot C, Brain E, Delaloge S, Giachetti S, de Cremoux P, Salmon R, Vincent-Salomon A, Marty M. Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial. *Clin Cancer Res.* 2008 Nov 1;14(21):7004-10.
- 105 Choy A, McCulloch P. Induction of tumour cell shedding into effluent venous blood breast cancer surgery. *Br J Cancer.* 1996 Jan;73(1):79-82.
- 106 Morris VL, Schmidt EE, MacDonald IC, Groom AC, Chambers AF. Sequential steps in hematogenous metastasis of cancer cells studied by in vivo videomicroscopy. *Invasion Metastasis.* 1997;17(6):281-96.
- 107 Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ, Kaufmann M, Diebold J, Arnholdt H, Muller P, Bischoff J, Harich D, Schlimok G, Riethmuller G, Eils R, Klein CA. From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jun 24;100(13):7737-42.

- 108 Ring A, Smith IE, Dowsett M. Circulating tumour cells in breast cancer. *Lancet Oncol.* 2004 Feb;5(2):79-88.
- 109 Chambers AF, Naumov GN, Varghese HJ, Nadkarni KV, MacDonald IC, Groom AC. : an overview. *Surg Oncol Clin N Am.* 2001 Apr;10(2):243-55, vii.
- 110 McCulloch P, Choy A, Martin L. Association between tumour angiogenesis and tumour cell shedding into effluent venous blood during breast cancer surgery. *Lancet.* 1995 Nov 18;346(8986):1334-5.
- 111 Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, Ethier SP, Terry VH, Roth MS. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol.* 1994 Mar; 12(3):475-82.
- 112 Hu X, Loo W. Surgery-related shedding of breast cancer cells as determined by RT-PCR assay. *J. Surg. Oncol.* 2003. 82:228-232.
- 113 Retsky M, Demicheli R, Hrushesky WJ: Does surgery induce angiogenesis in breast cancer? Indirect evidence from relapse pattern and mammography paradox. *Int J Surg.* 2005;3(3):179-87.
- 114 Moreno A, Roman JM, Ruiz J, Cabrera M, González A, Carreras JL, Aguilar A, Vidart JA. Biopsia del ganglio centinela en el carcinoma de mama: validación de la técnica radioisotópica. *Prog Obstet Ginecol.* 2005;48:436-43.
- 115 Vidal-Sicart S. Protocolo de actuación en ganglio centinela en el cáncer de mama, Medicina Nuclear, Hospital Clínic/CRC-Mar Barcelona.
- 116 Mucientes Rasilla J, Farge Balbín L, Cardona Arboniés J, Moreno Elola-Olaso A, Delgado-Bolton R, Izarduy Pereyra L, Rodríguez Rey C, Lapeña Gutiérrez L, González Maté A, Román Santamaría JM, Carreras Delgado JL. [SPECT-CT: a new tool for localisation of sentinel lymph nodes in breast cancer patients]. *Rev Esp Med Nucl.* 2008 May-Jun;27(3):183-90.
- 117 Hardisson D. Ganglio centinela en cáncer de mama: algunas repuestas que se plantean en la práctica diaria. Dpto. de Anatomía patológica. Hospital Universitario La Paz.
- 118 Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, Jeong JH, Wolmark N Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med.* 2002 Oct 17;347(16):1233-41.
- 119 Bednarz-Knoll N, Alix-Panabières C, Pantel K Clinical relevance and biology of circulating tumor cells. *Breast Cancer Res.* 2011;13(6):228.

-
- 120 Riethdorf S, Pantel K. Disseminated tumor cells in bone marrow and circulating tumor cells in blood of breast cancer patients: current state of detection and characterization. *Pathobiology*. 2008;75(2):140-8.
- 121 Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, Stopeck A, Borden E, Miller MC, Matera J, Repollet M, Doyle GV, Terstappen LW, Hayes DF. Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 Nov 1;12(21):6403-9.
- 122 Alsamarai S, Abu-Khalaf MM, Harris LN. DTCs/CTC in breast cancer: five decades later. *Recent Results Cancer Res*. 2012;195:217-25.
- 123 Rack B, Andergassen U, Janni W, Neugebauer J. CTC in primary breast cancer (I). *Recent Results Cancer Res*. 2012;195:179-85. Review.
- 124 Krishnamurthy S, Cristofanilli M, Singh B, Reuben J, Gao H, Cohen EN, Andreopoulou E, Hall CS, Lodhi A, Jackson S, Lucci A. Detection of minimal residual disease in blood and bone marrow in early stage breast cancer. *Cancer*. 2010 Jul 15;116(14):3330-7.
- 125 Lucci A, Hall CS, Lodhi AK, Bhattacharyya A, Anderson AE, Xiao L, Bedrosian I, Kuerer HM, Krishnamurthy S. Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study. *Lancet Oncol*. 2012 Jul;13(7):688-95.
- 126 Bidard FC, Mathiot C, Delaloge S, Brain E, Giachetti S, de Cremoux P, Marty M, Pierga JY. Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 2010 Apr;21(4):729-33.
- 127 Rack B, Schindlbeck C, Andergassen U, Schneeweiss A, Zwingers T, Lichtenegger W, Beckmann MW, Sommer H, Pantel K, Janni W: Use of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood of breast cancer patients before and after adjuvant chemotherapy to predict risk for relapse: The SUCCESS trial. *J Clin Oncol* 2010;28:15s.
- 128 Taubert H, Blumke K, Bilkenroth U, Meye A, Kutz A, Bartel F, et al. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation to nodal status and occurrence of metastases. *Gynecol Oncol*. 2004:256–261.
- 129 Nakagawa T, Martinez SR, Goto Y, Koyanagi K, Kitago M, Shingai T, Elashoff DA, Ye X, Singer FR, Giuliano AE, Hoon DS. Detection of circulating tumor cells in early-stage breast cancer metastasis to axillary lymph nodes. *Clin Cancer Res*. 2007 Jul 15;13(14):4105-10.
- 130 Lang JE, Mosalpuria K, Cristofanilli M, Krishnamurthy S, Reuben J, Singh B, et al. HER2 status predicts the presence of circulating tumor cells in patients with operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2009;113:501-7.

- 131 Zhao S, Liu Y, Zhang Q, Li H, Zhang M, Ma W, Zhao W, Wang J, Yang M. The prognostic role of circulating tumor cells (CTC) detected by RT-PCR in breast cancer: a meta-analysis of published literature. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Dec;130(3):809-16.
- 132 Retsky MW, Demicheli R, Hrushesky WJ, Baum M, Gukas ID Dormancy and surgery-driven escape from dormancy help explain some clinical features of breast cancer. *APMIS*. 2008 Jul-Aug;116(7-8):730-41. doi: 10.1111/j.1600-0463.2008.00990.x.
- 133 Camara O, Kavallaris A, Nöschel H, Rengsberger M, Jörke C, Pachmann K. Seeding of epithelial cells into circulation during surgery for breast cancer: the fate of malignant and benign mobilized cells. *World J Surg Oncol*. 2006; 4: 67.
- 134 Galán M, Viñolas N, Colomer D, Soler G, Muñoz M, Longarón R, Ventura PJ, Gascón P, Estapé J. Detection of occult breast cancer cells by amplification of CK19 mRNA by reverse transcriptase-polymerase chain reaction: role of surgical manipulation. *Anticancer Res*. 2002 Sep-Oct; 22(5):2877-84.
- 135 Hekimian K, Meisezahl S, Trompelt K, Rabenstein C, Pachmann K. Epithelial cell dissemination and readhesion: analysis of factors contributing to metastasis formation in breast cancer. *ISRN Oncol*. 2012;2012:601810.
- 136 Daskalakis M, Mavroudis D, Sanidas E, Apostolaki S, Askoxylakis I, de Bree E, Georgoulas V, Melissas J. Assessment of the effect of surgery on the kinetics of circulating tumour cells in patients with operable breast cancer based on cytokeratin-19 mRNA detection. *Eur J Surg Oncol*. 2011 May;37(5):404-10.
- 137 Franken B, Degroot MR, Mastboom WJ, Vermes I, Vanderpalen J, Tibbe AG, Terstappen LW. Circulating tumor cells, disease recurrence and survival in newly diagnosed breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2012 Oct 22;14(5):R133.
- 138 Zhang L, Riethdorf S, Wu G, Wang T, Yang K, Peng G, Liu J, Pantel K. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2012 Oct 15;18(20):5701-10.
- 139 Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, Apostolaki S, Bolonaki I, Stathopoulou A, Kalbakis K, Androulakis N, Kouroussis C, Pallis T, Christophylakis C, Argyraki K, Lianidou ES, Stathopoulos S, Georgoulas V, Mavroudis D. Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol*. 2006 Aug 10;24(23):3756-62.
- 140 Ignatiadis M, Xenidis N, Perraki M, Apostolaki S, Politaki E, Kafousi M, Stathopoulos EN, Stathopoulou A, Lianidou E, Chlouverakis G, Sotiriou C, Georgoulas V, Mavroudis D. Different prognostic value of cytokeratin-19 mRNA positive circulating tumor cells according to estrogen receptor and HER2 status in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Nov 20;25(33):5194-202. Epub 2007 Oct 22.

-
- 141 Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A, de Cremoux P, Nos C, Blin N, Pouillart P, Thiery JP, Magdelénat. Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2004 Feb 15;10(4):1392-400.
- 142 Wiedswang G, Borgen E, Schirmer C, Kåresen R, Kvalheim G, Nesland JM, Naume B. Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer. *Int J Cancer*. 2006 Apr 15;118(8):2013-9.
- 143 Wülfing P, Borchard J, Buerger H, Heidl S, Zänker KS, Kiesel L, Brandt B. HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2006 Mar 15;12(6):1715-20.
- 144 Ntoulia M, Stathopoulou A, Ignatiadis M, Malamos N, Mavroudis D, Georgoulis V, Lianidou ES. Detection of Mammaglobin A-mRNA-positive circulating tumor cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer with nested RT-PCR. *Clin Biochem*. 2006 Sep;39(9):879-87. Epub 2006 Jul 20.
- 145 Ignatiadis M, Kallergi G, Ntoulia M, Perraki M, Apostolaki S, Kafousi M, Chlouverakis G, Stathopoulos E, Lianidou E, Georgoulis V, Mavroudis D. Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2008 May 1;14(9):2593-600.
- 146 Ring AE, Zabaglo L, Ormerod MG, Smith IE, Dowsett M. Detection of circulating epithelial cells in the blood of patients with breast cancer: comparison of three techniques. *Br J Cancer*. 2005 Mar 14;92(5):906-12.
- 147 Barrière G, Riouallon A, Renaudie J, Tartary M, Rigaud M. Mesenchymal and stemness circulating tumor cells in early breast cancer diagnosis. *BMC Cancer*. 2012 Mar 23;12:114
- 148 Andreopoulou E, Yang LY, Rangel KM, Reuben JM, Hsu L, Krishnamurthy S, Valero V, Fritsche HA, Cristofanilli M. Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/Detect™ versus Veridex CellSearch™ system. *Int J Cancer*. 2012 Apr 1;130(7):1590-7.
- 149 Saphner T, Tormey DC, Gray R. Annual hazard rates of recurrence for breast cancer after primary therapy. *J Clin Oncol*. 1996 Oct;14(10):2738-46.
- 150 Demicheli R, Abbattista A, Miceli R, Valagussa P, Bonadonna G. Time distribution of the recurrence risk for breast cancer patients undergoing mastectomy: further support about the concept of tumor dormancy. *Breast Cancer Res Treat*. 1996;41(2):177-85.
- 151 Walker RA, Hanby A, Pinder SE, Thomas J, Ellis IO; Current issues in diagnostic breast pathology. *J Clin Pathol*. 2012 Sep;65(9):771-85.

152 Hwang SB, Bae JW, Lee HY, Kim HY. Circulating Tumor Cells Detected by RT-PCR for CK-20 before Surgery Indicate Worse Prognostic Impact in Triple-Negative and HER2 Subtype Breast Cancer. *J Breast Cancer*. 2012 Mar;15(1):34-42.

153 AJCC. Cancer Staging Manual. New York, NY:Springer,2012

154 Veronesi U, Paganelli G, Galimberti V, Viale G, Zurrada S, Bedoni M, Costa A, de Cicco C, Geraghty JG, Luini A, Sacchini V, Veronesi P. Sentinel-node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph-nodes. *Lancet*. 1997 Jun 28;349(9069):1864-7.

155 Dabbs DJ, Fung M, Johnson R. Intraoperative cytologic examination of breast sentinel lymph nodes: test utility and patient impact. *Breast J*. 2004 May-Jun;10(3):190-4.

156 Fujishima M, Watatani M, Inui H, Hashimoto Y, Yamamoto N, Hojo T, Hirai K, Yamato M, Shiozaki H. Touch imprint cytology with cytokeratin immunostaining versus Papanicolau staining for intraoperative evaluation of sentinel lymph node metastasis in clinically node-negative breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2009 Apr;35(4):398-402.

157 Clarke D, Leung E, Chachlani N, Rowlands D, Simon J, Hero I, England D. Intraoperative assessment of sentinel node using imprint cytology. *World J Surg*. 2010 Jan;34(1):55-61.

158 Krishnamurthy S, Meric-Bernstam F, Lucci A, Hwang RF, Kuerer HM, Babiera G, Ames FC, Feig BW, Ross MI, Singletary E, Hunt KK, Bedrosian I. A prospective study comparing touch imprint cytology, frozen section analysis, and rapid cytokeratin immunostain for intraoperative evaluation of axillary sentinel lymph nodes in breast cancer. *Cancer*. 2009 Apr 1;115(7):1555-62.

159 Verbanac KM, Min CJ, Mannie AE, Lu J, O'Brien KF, Rosman M, Taft L; ECU/AAMC Sentinel Node Study Group. Long-term follow-up study of a prospective multicenter sentinel node trial: molecular detection of breast cancer sentinel node metastases. *Ann Surg Oncol*. 2010 Oct;17 Suppl 3:368-77.

160 Wallwiener CW, Wallwiener M, Kurth HR, Röhm C, Neubauer H, Banys MJ, Staebler A, Schönfisch B, Meuer SC, Giese T, Fehm TN. Molecular detection of breast cancer metastasis in sentinel lymph nodes by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR): identifying, evaluating and establishing multi-marker panels. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Dec;130(3):833-44

161 Julian TB, Blumencranz P, Deck K, Whitworth P, Berry DA, Berry SM, Rosenberg A, Chagpar AB, Reintgen D, Beitsch P, Simmons R, Saha S, Mamounas EP, Giuliano A. Novel intraoperative molecular test for sentinel lymph node metastases in patients with early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Jul 10;26(20):3338-45.

162 Martin Martinez MD, Veys I, Majjaj S, Lespagnard L, Schobbens JC, Rouas G, Filippov V, Noterman D, Hertens D, Feoli F, Bourgeois P, Durbecq V, Larsimont D,

Nogaret JM. Clinical validation of a molecular assay for intra-operative detection of metastases in breast sentinel lymph nodes. *Eur J Surg Oncol*. 2009 Apr;35(4):387-92.

163 Blumencranz PW, Pieretti M, Allen KG, Blumencranz LE. Molecular analysis of breast sentinel lymph nodes. *Surg Oncol Clin N Am*. 2011 Jul;20(3):467-85, viii.

164 Visser M, Jiwa M, Horstman A, Brink AA, Pol RP, van Diest P, Snijders PJ, Meijer CJ. Intra-operative rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. *Int J Cancer*. 2008 Jun 1;122(11):2562-7.

165 Schem C, Maass N, Bauerschlag DO, Carstensen MH, Löning T, Roder C, Batic O, Jonat W, Tiemann K. One-step nucleic acid amplification-a molecular method for the detection of lymph node metastases in breast cancer patients; results of the German study group. *Virchows Arch*. 2009 Feb;454(2):203-10.

166 Tamaki Y, Sato N, Homma K, Takabatake D, Nishimura R, Tsujimoto M, Yoshidome K, Tsuda H, Kinoshita T, Kato H, Taniyama K, Kamio T, Nakamura S, Akiyama F, Noguchi S. Routine clinical use of the one-step nucleic acid amplification assay for detection of sentinel lymph node metastases in breast cancer patients: results of a multicenter study in Japan. *Cancer*. 2012 Jul 15;118(14):3477-83.

167 de la Puente Yagüe, M. Estudio biomolecular a tiempo real del ganglio centinela en carcinoma de mama. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, 2011.

168 Moreno A, Roman JM, De la Puente M, Vidaurreta M, Maestro ML, Merchan MJ, Furio V, Prieto A, Vidart JA, Asenjo JA. Real-time polymerase chain reaction to detect micrometastases in sentinel nodes. *European Journal of Cancer Supplements*, Volume 8, Issue 3, March 2010, Page 155.

169 Fisher CS, Cole DJ, Mitas M, Garrett-Meyer E, Metcalf JS, Gillanders WE, Mikhitarian K, Urist MM, Mann GB, Doherty G, Herrmann VM, Hill AD, Eremin O, El-Sheemy M, Orr RK, Valle AA, Henderson MA, Dewitty RL, Sugg SL, Frykberg E, Yeh K, Bell RM, Baker MK. Molecular detection of micrometastatic breast cancer in histopathology-negative axillary lymph nodes fails to predict breast cancer recurrence: a final analysis of a prospective multi-institutional cohort study. *Ann Surg Oncol*. 2010 Oct;17 Suppl 3:312-20.

170 Bleiweiss IJ, Nagi CS, Jaffer S. Axillary sentinel lymph nodes can be falsely positive due to iatrogenic displacement and transport of benign epithelial cells in patients with breast carcinoma. *J Clin Oncol*. 2006 May 1;24(13):2013-8.

171 Wasif N, Maggard MA, Ko CY, Giuliano AE. Underuse of axillary dissection for the management of sentinel node micrometastases in breast cancer. *Arch Surg*. 2010 Feb;145(2):161-6.

172 Jafferbhoy S, McWilliams B. Clinical significance and management of sentinel node micrometastasis in invasive breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2012 Oct;12(5):308-12.

173 Bernet L, Cano R, Martinez M, Dueñas B, Matias-Guiu X, Morell L, Palacios J, Rezola R, Robles-Frias M, Ruiz I, Velasco A, Vieites B, Sevilla F, Torro J, Medrano J, Ballester B. Diagnosis of the sentinel lymph node in breast cancer: a reproducible molecular method: a multicentric Spanish study. *Histopathology*. 2011 May;58(6):863-9.

ANEXO

Resultados no significativos. Relación de variables con la supervivencia

A1. Resultados de la comparación de las curvas de supervivencias

TABLA A.1. Comparación de las curvas de supervivencia para SG.

VARIABLES	Test Log-Rank	Test Breslow
AF1GRADOMAMA	0,977	0,789
APCANCERMAMA	0,792	0,792
APOTROSGINE	0,745	0,745
HALLAZGO	0,750	0,931
LADOMAMA	0,176	0,168
PALPABLE	0,885	0,946
ECOSINO	0,061	0,064
PAAFSINO	0,124	0,162
BAGSINO	0,756	0,924
DIAGNOSTICO	0,148	0,206
MULTIFOCO	0,367	0,380
ARPON	0,623	0,847
CIRUGIA	0,522	0,543
BIOPSIAGC	0,460	0,506
APDIFERIDATUMOR	0,980	0,989
APDIFERIDAGC	0,440	0,483
GRADOELSTON	0,597	0,682
INVASIONLINFOVASCULAR	0,853	0,853
COMPONENTEINSITU	0,367	0,397
LINFADENECTOMIA	0,385	0,418
QTPOSTQCA	0,845	0,809
RTPOSTQCA	0,240	0,252
HTPOST	0,366	0,196
ACOTHSINO	0,460	0,506
ESTIRPE	0,568	0,641
TNM	0,932	0,629
TNMTIPO	0,898	0,410
TNMSUBTIPO	0,688	0,697
MG	0,636	0,636
CK19	0,568	0,640
PCR	0,522	0,582
MTSGC2MM	0,460	0,506
HER2PN	0,501	0,555
KI67M25	0,320	0,675
RPM25	0,554	0,386
CTCR0	0,102	0,129
CTC2R2	0,054	0,844
CTC2R3	0,270	0,462

* Niveles de significación. Nivel de referencia para ambos tests $p < 0,05$

TABLA A.2. Comparación de las curvas de supervivencia para SLE.

VARIABLES	Test Log-Rank	Test Breslow
AF1GRADOMAMA	0,914	0,789
APCANCERMAMA	0,792	0,792
APOTROSGINE	0,657	0,708
HALLAZGO	0,776	0,931
LADOMAMA	0,153	0,163
PALPABLE	0,692	0,943
PAAFSINO	0,115	0,150
BAGSINO	0,706	1,000
DIAGNOSTICO	0,119	0,184
MULTIFOCO	0,350	0,385
ARPON	0,720	0,905
CIRUGIA	0,473	0,517
BIOPSIAGC	0,482	0,507
APDIFERIDATUMOR	0,980	0,988
APDIFERIDAGC	0,419	0,467
GRADOELSTON	0,686	0,683
INVASIONLINFOVASCULAR	0,853	0,853
COMPONENTEINSITU	0,383	0,398
LINFADENECTOMIA	0,367	0,404
QTPSTQCA	0,867	0,867
RTPOSTQCA	0,230	0,244
HTPOST	0,331	0,230
ACOTHSINO	0,482	0,507
ESTIRPE	0,568	0,628
TNM	0,864	0,599
TNMTIPO	0,939	0,474
TNMSUBTIPO	0,652	0,642
MG	0,636	0,636
CK19	0,600	0,641
PCR	0,550	0,583
MTSGC2MM	0,437	0,489
HER2PN	0,526	0,556
KI67M25	0,282	0,588
RPM25	0,627	0,443
CTCR0	0,094	0,120
CTC2R3	0,282	0,469

* Niveles de significación. Nivel de referencia para ambos tests $p < 0,05$

A2. Resultados de la regresión de Cox univariable

TABLA A3. SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG). Análisis univariable mediante Regresión de Cox.

<i>Pacientes de Cáncer de Mama</i>	HR	IC95% (inferior)	IC95% (superior)	p*
Variables cuantitativas				
CTC1 (n=59)	2,57	0,83	7,92	0,137
CTC2 (n=59)	3,43	0,72	16,39	0,135
EDAD (n=60)	1,02	0,92	1,13	0,762
NUM. GESTACIONES (n=60)	1,40	0,53	3,67	0,488
BIRADS (n=60)	4,59	0,33	63,87	0,140
NUM. CIRUGÍAS (n=60)	3,68	0,58	23,15	0,193
NUM. ARPÓN (n=60)	0,53	0,05	5,23	0,566
TAMAÑO TUMOR (mm)	1,00	0,89	1,12	0,954
TAMAÑO MTS-GC (mm)	5,47E-06	0,00	-	0,317
NUM. GC (n=60)	1,94	0,60	6,28	0,284
NUM. GC POSITIVOS (n=60)	1,40E-16	0,00	-	0,317
Variables cualitativas				
GRADO ELSTON (n=58)				0,421
G1 (n=16)	1,00			
G2 (n=32)	0,82	0,07	9,27	
G3 (n=10)	1,16E-16	0,00	-	
BIOPSIA GC (n=60)				0,317
Negativo (n=50)	1,00			
Positivo (n=10)	6,49E-17	0,00	-	
CTC (categorizado; suma CTC1+CTC2)				0,051
Ninguna (n=30)	1,00			
Al menos una (n=29)	4,85E+15	0,00	-	
CTC1 (Ninguna/Al menos una)				0,110
Ninguna (n=41)	1,00			
De 1 - 4 (n=18)	7,02	0,59	83,71	
CTC2 (Ninguna/Al menos una)				0,282
Ninguna (n=41)	1,00			
De 1 - 4 (n=18)	3,63	0,32	41,65	
CTC1 (<=2/+2 cel)				0,127
<= 2 cel. (n=54)	1,00			
+ 2 cel. (n=5)	10,70	0,67	171,06	
CTC2 (<=2/+2 cel)				0,153
<= 2 cel. (n=57)	1,00			
+ 2 cel. (n=2)	8,35	0,66	104,76	
AF 1ºGRADO MAMA				0,977
No (n=37)	1,00			
Sí (n=23)	0,97	0,09	10,89	
ACOTHS				0,317
No (n=50)	1,00			
Sí (n=10)	6,49E-17	0,00	-	
AP CANCER MAMA				0,712
No (n=58)	1,00			
Sí (n=2)	5,97E-16	0,00	-	
AP OTROS GINECOLÓGICOS				0,649
No (n=58)	1,00			
Sí (n=2)	5,81E-16	0,00	-	
HALLAZGO				0,676
Clínico (n=31)	1,00			
Mamografía (n=26)	0,51	0,05	5,74	
Ecografía (n=3)	1,90E-17	0,00	-	

LADO MAMA				0,094
Izquierda (n=58)	1,00			
Derecha (n=2)	3,24E-17	0,00	-	
PALPABLE				0,593
No (n=58)				
Si (n=2)	1,92	0,17	22,19	
MAMOGRAFÍA				0,852
No (n=1)	1,00	-	-	
Densidad asimétrica (n=4)	1,00	0,00	-	
Distorsión (n=6)	1,00	0,00	-	
Micros (n=9)	1,11	0,00	-	
Nódulos (n=36)	3,72E+15	0,00	-	
Normal (n=1)	1,33	0,00	-	
Otros (n=3)	1,00	0,00	-	
ECOGRAFIA				0,154
No (n=6)	1,00			
Si (n=54)	0,11	0,01	1,79	
PAAF				0,062
No (n=28)	1,00			
Si (n=32)	1,58E+15	0,00	-	
BAG				0,753
No (n=33)	1,00			
Si (n=27)	0,68	0,06	7,58	
DIAGNOSTICO				0,085
Bag (n=22)	1,00			
Biopsia (n=13)	0,36	0,00	-	
Paaf (n=25)	2,55E+15	0,00	-	
LOCALIZACIÓN (cuadrantes)				0,479
CIE (n=8)	1,00	0,00	-	
CII (n=2)	2,78E-07	8,25E+08	2,11E+11	
CSE (n=23)	1,32E+10	0,00	-	
Varios (n=3)	2,78E-07	0,00	-	
CSI (n=9)	2,97E-06	0,00	-	
ICE (n=4)	2,70E-07	0,00	-	
ICS (n=8)	2,26E-06	0,00	-	
Retroareolar (n=3)	9,98E+10	-	-	
MULTIFOCALIDAD				0,232
No (n=45)	1,00			
Si (n=15)	1,52E-16	0,00	-	
ARPÓN				0,619
No (n=36)	1,00			
Si (n=24)	0,54	0,05	6,35	
CIRUGIA				0,348
Recambio prótesis (n=1)	1,00			
Mastectomía (n=21)	0,40	0,00	-	
Tumorectomía (n=38)	4,55E+14	-	-	
AP DIFERIDA GC				0,298
No (n=49)	1,00			
Si (n=11)	6,32E-17	0,00	-	
AP DIFERIDA TUMOR				0,927
Ductal infiltrante (n=43)	1,00	0,00	-	
Adenoide quístico (n=1)	4,94E-17	0,00	-	
Lobulillar (n=11)	5,09E-17	0,00	-	
Mucinoso (n=2)	4,94E-17	0,00	-	
Tubular (n=1)	4,94E-17	0,00	-	
Ductolobulillar (n=1)	4,94E-17	0,00	-	
Tubulolobulillar (n=1)	4,94E-17	0,00	-	

ESTIRPE				0,383
Ductal infiltrante (n=43)	1,00			
Lobulillar (n=11)	5,09E-17	0,00	-	
Otros (n=6)	4,94E-17	0,00	-	
MTS-GC 2mm				0,317
<= 2mm (n=50)	1,00			
+ 2mm (n=10)	4,40E-16	0,00	-	
LINFADECTOMIA				0,247
No (n=46)	1,00			
Sí (n=14)	5,79E-17	0,00	-	
COMPONENTE IN SITU				0,232
No (n=45)	1,00			
Sí (n=15)	5,61E-17	0,00	-	
INVASION LINFO-VASCULAR				0,795
No (n=59)	1,00			
Sí (n=1)	2,26E-16	0,00	-	
CERBB2				0,621
< 25% (n=48)	1,00			
25 - 50% (n=2)	4,38E-17	0,00	-	
50 - 75% (n=1)	6,02E-17	0,00	-	
> 75% (n=8)	5,28E-17	0,00	-	
KI67				0,467
< 25% (n=36)	1,00			
25 - 50% (n=16)	2,69	0,16	43,99	
50 - 75% (n=3)	8,29	0,49	139,04	
> 75% (n=4)	1,83E-15	0,00	-	
RE				0,269
< 25% (n=14)	1,00			
25 - 50% (n=2)	5,21E-17	0,00	-	
50 - 75% (n=8)	5,20E-17	0,00	-	
> 75% (n=34)	0,16	0,01	1,90	
RE (25%)				0,071
< 25% (n=10)	1,00			
+ 25% (n=49)	0,11	0,01	1,29	
RP				0,616
< 25% (n=14)	1,00			
25 - 50% (n=2)	1,71E-17	0,00	-	
50 - 75% (n=8)	1,31E-17	0,00	-	
> 75% (n=34)	0,69	0,06	7,66	
RP (25%)				0,579
< 25% (n=14)	1,00			
+ 25% (n=44)	0,49	0,04	5,54	
MAMOGLOBINA				0,514
Negativo (n=54)	1,00			
Positivo (n=6)	1,96E-16	0,00	-	
CK19				0,432
Negativo (n=55)	1,00			
Positivo (n=5)	7,19E-17	0,00	-	
PCR				0,381
Negativo (n=53)	1,00			
Positivo (n=7)	5,14E-16	0,00	-	
HER2 (P/N)				0,358
Negativo (<75%) (n=52)	1,00			
Positivo (+75% & FISH+) (n=8)	1,85E-16	0,00	-	
KI67 (25%)				0,328
< 25% (n=36)	1,00			
+ 25% (n=23)	3,17	0,29	34,95	

TRIPLE NEGATIVO				0,897
Completamente negativo (n=5)	1,00			
Al menos uno no es negativo (n=55)	0,85	0,07	9,83	
TNM (tipo+subtipo)				0,898
T1mic (n=4)	1,00			
T1a (n=6)	8,32E-07	0,00		
T1b (n=8)	1,29E+09	-		
T1c (n=24)	6,05E+08	3,59E+07	1,02E+10	
T2 (n=18)	6,00E+08	3,75E+07	9,61E+09	
TNM (tipo)				0,897
T1 (n=42)	1,00			
T2 (n=18)	0,85	0,07	9,83	
TNM (subtipo)				0,647
T1mic (n=4)	1,00			
T1a (n=6)	6,14E-06	0,00	-	
T1b (n=8)	5,80E+09	3,63E+08	9,27E+10	
T1c (n=24)	1,97E+09	-	-	
QTPOSTQCA				0,844
No (n=36)	1,00			
Sí (n=24)	0,79	0,07	8,69	
RTPOSTQCA				0,136
No (n=23)	1,00			
Sí (n=37)	3,27E+15	0,00	-	
HTPOST				0,422
No (n=10)	1,00			
Sí (n=50)	0,35	0,03	3,84	

IC95%: intervalo de confianza del 95% de HR; HR calculado mediante la Regresión de Cox, modelo de riesgos proporcionales.

* Nivel de significación calculado por el test -2LL, nivel de referencia p=0,05.

TABLA A4. SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD. Análisis univariable mediante Regresión de Cox.

<i>Pacientes de Cáncer de Mama</i>	HR	IC95% (inferior)	IC95% (superior)	p*
Variables cuantitativas				
CTC1 (n=59)	2,67	0,87	8,21	0,122
CTC2 (n=59)	3,71	0,76	18,18	0,119
EDAD (n=60)	1,02	0,92	1,13	0,701
NUM. GESTACIONES (n=60)	1,50	0,59	3,83	0,382
BIRADS (n=60)	4,33	0,32	59,10	0,147
NUM. CIRUGÍAS (n=60)	3,13	0,47	20,98	0,264
NUM. ARPÓN (n=60)	0,61	0,07	5,60	0,650
TAMAÑO TUMOR (mm)	1,01	0,90	1,13	0,883
TAMAÑO MTS-GC (mm)	1,32E-05	0,00	-	0,294
NUM. GC (n=60)	1,60	0,58	4,44	0,393
NUM. GC POSITIVOS (n=60)	1,49E-16	0,00	-	0,340
Variables cualitativas				
GRADO ELSTON (n=58)				0,512
G1 (n=16)	1,00			
G2 (n=32)	0,98	0,09	10,80	
G3 (n=10)	4,28E-16	0,00	-	
BIOPSIA GC (n=60)				0,340
Negativo (n=50)	1,00			
Positivo (n=10)	6,55E-17	0,00	-	

CTC1 (Ninguna/Al menos una)				0,090
Ninguna (n=41)	1,00			
De 1 - 4 (n=18)	8,45	0,65	109,40	
CTC2 (Ninguna/Al menos una)				0,293
Ninguna (n=41)	1,00			
De 1 - 4 (n=18)	3,53	0,31	40,27	
CTC1 (<=2/+2 cel)				0,112
<= 2 cel. (n=54)	1,00			
+ 2 cel. (n=5)	12,07	0,75	193,88	
CTC2 (<=2/+2 cel)				0,120
<= 2 cel. (n=57)	1,00			
+ 2 cel. (n=2)	10,01	0,86	116,96	
AF 1° GRADO MAMA				0,914
No (n=37)	1,00			
Sí (n=23)	0,88	0,08	9,69	
ACOTHS				0,340
No (n=50)	1,00			
Sí (n=10)	4,84E-16	0,00	-	
AP CANCER MAMA				0,712
No (n=58)	1,00			
Sí (n=2)	5,97E-16	0,00	-	
AP OTROS GINECOLÓGICOS				0,537
No (n=58)	1,00			
Sí (n=2)	5,66E-16	0,00	-	
HALLAZGO				0,712
Clínico (n=31)	1,00			
Mamografía (n=26)	0,52	0,05	5,79	
Ecografía (n=3)	5,53E-17	0,00	-	
LADO MAMA				0,077
Izquierda (n=58)	1,00			
Derecha (n=2)	3,31E-17	0,00	-	
PALPABLE				0,688
No (n=58)	1,00			
Sí (n=2)	1,62	0,15	17,98	
MAMOGRAFÍA				0,852
No (n=1)	1,00			
Densidad asimétrica (n=4)	1,00	0,00	-	
Distorsión (n=6)	1,00	0,00	-	
Micros (n=9)	1,08	0,00	-	
Nódulos (n=36)	1,01E+16	0,00	-	
Normal (n=1)	1,28	0,00	-	
Otros (n=3)	1,17	0,00	-	
ECOGRAFIA				0,139
No (n=6)	1,00			
Sí (n=54)	0,10	0,01	1,63	
PAAF				0,057
No (n=28)	1,00			
Sí (n=32)	1,64E+15	0,00	-	
BAG				0,702
No (n=33)	1,00			
Sí (n=27)	0,63	0,06	6,98	
DIAGNOSTICO				0,071
Bag (n=22)	1,00			
Biopsia (n=13)	0,05	0,00	-	
Paaf (n=25)	2,92E+15	0,00	-	

LOCALIZACIÓN (cuadrantes)				0,442
CIE (n=8)	1,00			
CII (n=2)	7,65E-09	-	-	
CSE (n=23)	1,00E+10	6,19E+08	1,63E+11	
Varios (n=3)	7,65E-09	-	-	
CSI (n=9)	6,82E-10	-	-	
ICE (n=4)	2,81E-09	-	-	
ICS (n=8)	1,50E-09	-	-	
Retroareolar (n=3)	9,42E+10	-	-	
MULTIFOCALIDAD				0,217
No (n=45)	1,00			
Sí (n=15)	4,11E-16	0,00	-	
ARPÓN				0,716
No (n=36)	1,00			
Sí (n=24)	0,65	0,06	7,19	
CIRUGIA				0,298
Recambio prótesis (n=1)	1,00			
Mastectomía (n=21)	0,87	0,00	-	
Tumorectomía (n=38)	1,03E+15	0,00	-	
AP DIFERIDA GC				0,277
No (n=49)	1,00			
Sí (n=11)	1,69E-16	0,00	-	
AP DIFERIDA TUMOR				0,927
Ductal infiltrante (n=43)	1,00			
Adenoide quístico (n=1)	1,34E-16	0,00	-	
Lobulillar (n=11)	1,38E-16	0,00	-	
Mucinoso (n=2)	1,34E-16	0,00	-	
Tubular (n=1)	1,34E-16	0,00	-	
Ductolobulillar (n=1)	1,34E-16	0,00	-	
Tubulolobulillar (n=1)	1,34E-16	0,00	-	
ESTIRPE				0,383
Ductal infiltrante (n=43)	1,00			
Lobulillar (n=11)	1,38E-16	0,00	-	
Otros (n=6)	1,34E-16	0,00	-	
MTS-GC 2mm				0,294
<= 2mm (n=50)	1,00			
+ 2mm (n=10)	6,35E-17	0,00	-	
LINFADECTOMIA				0,231
No (n=46)	1,00			
Sí (n=14)	5,73E-17	0,00	-	
COMPONENTE IN SITU				0,248
No (n=45)	1,00			
Sí (n=15)	5,59E-17	0,00	-	
INVASION LINFO-VASCULAR				0,795
No (n=59)	1,00			
Sí (n=1)	1,23E-14	0,00	-	
CERBB2				0,704
< 25% (n=48)	1,00			
25 - 50% (n=2)	1,51E-16	0,00	-	
50 - 75% (n=1)	1,65E-16	0,00	-	
> 75% (n=8)	1,60E-16	0,00	-	
KI67				0,422
< 25% (n=36)	1,00			
25 - 50% (n=16)	2,71	0,17	43,84	
50 - 75% (n=3)	10,27	0,64	165,74	
> 75% (n=4)	3,30E-18	0,00	-	

RE				0,241
----	--	--	--	-------

< 25% (n=14)	1,00			
25 - 50% (n=2)	2,51E-17	0,00	-	
50 - 75% (n=8)	2,51E-17	0,00	-	
> 75% (n=34)	0,13	0,01	1,48	
RE (25%) (n=59)				0,056
< 25% (n=10)	1,00			
+ 25% (n=49)	0,10	0,01	1,13	
RP				0,706
< 25% (n=14)	1,00			
25 - 50% (n=2)	3,71E-16	0,00	-	
50 - 75% (n=8)	3,43E-16	0,00	-	
> 75% (n=34)	0,74	0,07	8,23	
RP (25%) (n=58)				0,644
< 25% (n=14)	1,00			
+ 25% (n=44)	0,55	0,05	6,19	
MAMOGLOBINA				0,514
Negativo (n=54)	1,00			
Positivo (n=6)	5,32E-16	0,00	-	
CK19				0,469
Negativo (n=55)	1,00			
Positivo (n=5)	5,48E-16	0,00	-	
PCR				0,411
Negativo (n=53)	1,00			
Positivo (n=7)	5,25E-16	0,00	-	
HER2 (P/N)				0,386
Negativo (<75%) (n=52)	1,00			
Positivo (+75% & FISH+) (n=8)	1,88E-16	0,00	-	
KI67 (25%)				0,293
< 25% (n=36)	1,00			
+ 25% (n=23)	3,45	0,31	38,21	
TRIPLE NEGATIVO				0,939
Completamente negativo (n=5)	1,00			
Al menos uno no es negativo (n=55)	1,10	0,10	12,13	
TNM (tipo+subtipo)				0,831
T1mic (n=4)	1,00			
T1a (n=6)	3,21E-07	0,00	-	
T1b (n=8)	1,67E+09	-	-	
T1c (n=24)	5,58E+08	3,54E+07	9,12E+09	
T2 (n=18)	7,42E+08	4,63E+07	1,19E+10	
TNM (tipo)				0,939
T1 (n=42)	1,00			
T2 (n=18)	1,10	0,10	12,13	
TNM (subtipo)				0,627
T1mic (n=4)	1,00			
T1a (n=6)	8,32E-07	0,00	-	
T1b (n=8)	6,79E+09	-	-	
T1c (n=24)	2,12E+09	1,32E+08	3,39E+10	
QTPOSTQCA				0,866
No (n=36)	1,00			
Sí (n=24)	0,81	0,07	9,03	
RTPOSTQCA				0,128
No (n=23)	1,00			
Sí (n=37)	8,83E+15	0,00	-	
HTPOST				0,393
No (n=10)	1,00			
Sí (n=50)	0,32	0,03	3,62	

IC95%: intervalo de confianza del 95%; HR calculado por Regresión de Cox * Nivel de significación por el test -2LL, nivel de referencia p=0,05.